

THÈSE

PRÉSENTÉE

A LA FACULTÉ DE PHARMACIE DE NANCY

POUR OBTENIR

LE TITRE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE NANCY
(MENTION "PHARMACIE")

PAR

Nicole BERTHOLD - GODEFROY

PHARMACIEN

Ex-Assistante à la Faculté de Médecine de Nancy
Diplômée d'Études Supérieures de Chimie Biologique
Diplômée de Biochimie Pharmaceutique et Technique
Diplômée de Microbiologie et de Sérologie (Université)
Diplômée d'Études Spéciales de Sérologie appliquée

Recherches sur l'absorption intestinale du Cholestérol à l'aide du dérivé marqué Influence de diverses substances stéroliques sur cette absorption

Soutenue le ²⁸ Mars 1960 devant la Commission d'Examen

Président M. KAYSER, Doyen de la Faculté de Pharmacie

Juges { M^{lle} BESSON, Professeur
 M. STEIMETZ, Professeur

Adjoint au jury M. WOLFF, Professeur à la Faculté de Médecine de Nancy

1960



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41555809_0017

THÈSE

PRÉSENTÉE

A LA FACULTÉ DE PHARMACIE DE NANCY

POUR OBTENIR

LE TITRE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE NANCY
(MENTION "PHARMACIE")

PAR

Nicole BERTHOLD - GODEFROY

PHARMACIEN

Ex-Assistante à la Faculté de Médecine de Nancy
Diplômée d'Études Supérieures de Chimie Biologique
Diplômée de Biochimie Pharmaceutique et Technique
Diplômée de Microbiologie et de Sérologie (Université)
Diplômée d'Études Spéciales de Sérologie appliquée

Recherches sur l'absorption intestinale du Cholestérol à l'aide du dérivé marqué Influence de diverses substances stéroliques sur cette absorption

Soutenue le 28 Mars 1960 devant la Commission d'Examen

Président M. KAYSER, Doyen de la Faculté de Pharmacie

Juges { M^{lle} BESSON, Professeur
 { M. STEIMETZ, Professeur

Adjoint au jury M. WOLFF, Professeur à la Faculté de Médecine de Nancy

UNIVERSITE DE NANCYFACULTÉ DE PHARMACIEADMINISTRATIONDOYEN

Professeur : F. KAYSER

ASSESSEUR

Professeur : A. MEUNIER

SECRETAIRE

B. SEUROT

Personnel EnseignantProfesseurs

M.	MEUNIER A.	Pharmacie galénique
Melle	FRANCOIS M.Th.	Matière médicale
MM.	KAYSER F.	Chimie
	FRANQUET R.	Botanique
	MARCHAL J.G.	Microbiologie
	STEIMETZ E.	Sciences Naturelles
	BLOCH J.M.	Toxicologie
	SOLEIL J.	Pharmacie chimique
	BERNANOSE A.	Physique
Melle	BESSON S.	Pharmacodynamie

Maître de conférences-Agrégé

M.	BENE R.	Microbiologie
----	---------	---------------

Chargés de cours complémentaires

M.	MEUNIER A.	Hydrologie
Melle	FRANCOIS M.Th.	Hygiène
MM.	KAYSER F.	Biochimie technique
	FRANQUET R.	Cryptogamie
	MARCHAL J.G.	Parasitologie
	STEIMETZ E.	Mycologie-Minéralogie
	BLOCH J.M.	Chimie minérale
	SOLEIL J.	Chimie organique
	BERNANOSE A.	Optique et Acoustique
	GRANGER (Professeur à la Faculté de Droit)	Déontologie
Melle	BESSON S.	Techniques spéciales et méthodes modernes d'analyses
M.	BENE R.	Bactériologie
M.	ANZIANI P.	Caractères analytiques des sels
Mme	LASSEUR A.	Techniques spéciales d'analyses bactériologiques
MM.	MIRJOLET M.	Chimie analytique
	PIERFITTE M.	C.E.S. Chimie biologique

Chefs de travaux

M.	ANZIANI P.	Chimie
Mme	LASSEUR A.	Microbiologie-Parasitologie
MM.	MIRJOLET M.	Sciences pharmaceutiques
	PIERFITTE M.	Chimie biologique
	VILLOUTREIX J. (délégué)	Micrographie
	MARTIN J.A. (délégué)	Chimie
Melle	GIRARD Th. (déléguée)	Microbiologie technique
Melle	LAURENT F. (déléguée)	Physique

Doyen honoraire : M. RICHARD, Recteur de l'Académie de
Montpellier.

Professeurs honoraires : M. CORDEBARD - M. DOURIS.

A MES PARENTS

A MON MARI

A MON MAITRE

Monsieur R. WOLFF

Professeur à la Faculté

de Médecine

AVANT - PROPOS

Le travail, que nous allons exposer, nous a été proposé par Monsieur le Professeur WOLFF et a été entièrement fait sous sa direction dans son laboratoire de Chimie Biologique à la Faculté de Médecin de Nancy.

Nous avons effectué ce travail avec l'assentiment de Monsieur le Professeur KAYSER, Doyen de la Faculté de Pharmacie de Nancy.

Nous désirons remercier et assurer de notre reconnaissance Monsieur le Doyen KAYSER grâce auquel nous avons acquis nos connaissances de Chimie Biologique.

Monsieur le Doyen KAYSER a toujours été pour nous un Maître bienveillant et nous apprécions l'honneur qu'il nous fait en acceptant de présider, aujourd'hui, notre jury de Thèse.

Nous sommes heureuse d'avoir l'occasion d'adresser à notre cher Maître, Monsieur le Professeur WOLFF, l'expression de toute notre gratitude pour la bienveillante sollicitude qu'il n'a cessé de nous témoigner pendant près de quatre ans.

Nous ayant accueillie dans son laboratoire, il s'est intéressé à toutes nos expériences, nous permettant de les mener à bien et nous dirigeant de ses conseils éclairés. Nous le remercions du dévouement avec lequel il nous a guidée et nous lui exprimons ici notre respectueuse affection.

Que Mademoiselle BESSON, Professeur à la Faculté de Pharmacie de Nancy, accepte aussi le témoignage de notre gratitude. Notre année de préparation au Certificat d'Etudes Supérieures de Chimie Biologique a contribué grandement à notre formation scientifique et nous a donné le goût de la Recherche. Ceci, grâce à la direction vigilante de Mademoiselle BESSON et à l'enseignement parfait et si humain qu'elle

nous a dispensé. C'est un grand honneur pour nous de la compter aujourd'hui au nombre de nos juges.

Nous exprimons nos vifs remerciements à Monsieur le Professeur STEIMETZ qui a bien voulu examiner notre travail avec attention et bienveillance, et qui a accepté de le juger. Nous lui en savons un gré infini.

Nous remercions très sincèrement Monsieur BRIGNON, Docteur en Pharmacie, Chef de Travaux à la Faculté de Médecine. Son aide amicale nous a permis de venir à bout des nombreux problèmes qui se posent aux débutants dans un laboratoire. Nous lui sommes aussi très reconnaissante d'avoir bien voulu assurer la préparation de plusieurs dérivés chimiques utilisés dans ce travail.

Nous n'aurions garde d'oublier tous ceux qui nous ont entourée de leur sympathie au laboratoire de Chimie Biologique; en particulier Mme VUILLEMIN-WEIS, Mme THIAVILLE-DUBOST, Melle FRANCOIS, Mr le Docteur PAYSANT. L'ambiance agréable et l'esprit d'équipe qu'ils ont su maintenir au laboratoire nous ont été un encouragement précieux.

Nous ne voudrions pas clore cet avant-propos sans remercier aussi la Fondation ROCKFELLER et le Centre National de la Recherche Scientifique pour l'appareillage dont ils ont doté le laboratoire, l'Institut National d'Hygiène que dirige Monsieur le Professeur BUGNARD et la Caisse Nationale de Sécurité Sociale pour leur aide matérielle généreuse. Grâce à ces organismes nous avons pu entreprendre et mener à bien ce travail.

RECHERCHES SUR L'ABSORPTION INTESTINALE DU CHOLESTEROL
A L'AIDE DU DÉRIVÉ MARQUÉ

INFLUENCE DE DIVERSES SUBSTANCES STÉROLIQUES
SUR CETTE ABSORPTION

INTRODUCTION

Depuis plusieurs années, les statistiques mettent en évidence une augmentation de la mortalité par atteinte coronarienne. Il ne faut pas trouver étonnant, dans ces conditions, que nombre de chercheurs se soient penchés sur le problème des artériopathies et surtout de l'athéromatose.

Cette affection dégénérative est caractérisée par un dépôt lipidique, surtout cholestérolique sur l'intima des artères. Mais ceci est une forme très pure, rencontrée surtout dans les athéromes expérimentaux de l'animal. Chez l'homme, les autopsies révèlent presque toujours l'association d'une calcification, d'une hyperplasie conjonctive et d'un dépôt de lipides.

L'origine de ce phénomène dégénératif est encore très discutée : deux facteurs entrent certainement en jeu :

un facteur local tissulaire

un facteur humoral

Le facteur local tissulaire semble indispensable au processus de l'athérome. La charpente élastique de l'artère est peut-être lésée mécaniquement par une trop forte pression sanguine ou subit, à certains endroits, des dégradations d'origine syphilitique ou inflammatoire. Elle offre alors une structure altérée sur laquelle des éléments anormaux viennent se loger, tels du calcium, des lipides, du cholestérol. On n'a jamais pu déterminer histologiquement quel corps prenait place le premier.

A côté du facteur local tissulaire, on a mis en évidence :

un facteur humoral

L'analyse sanguine chez bon nombre d'athéromateux révèle certaines particularités, telles que :

- des lipoprotéines augmentées avec un rapport :

$$\frac{\text{lipoprotéines } \beta}{\text{lipopr. } \alpha} = \text{supérieur à la normale.}$$

- une négativité du pouvoir cholestérolytique du plasma
- une cholestérolémie élevée
- un test de Kunkel très positif.

Le sang des athéromateux, par suite de ces perturbations lipidiques, laisserait déposer sur les artères, des graisses neutres, des phospholipides et beaucoup de cholestérol.

Cependant, ce facteur humoral ne semble pas prépondérant dans la genèse de l'affection, ceci pour deux raisons :

- il peut totalement faire défaut dans certains cas d'athéromatose : dans 1/4 à 1/3 des cas, où seuls sont constatés des changements tissulaires de la paroi des vaisseaux. C'est chez les diabétiques que le syndrome humoral de l'athéromatose est le plus constant.

- D'autre part, les plaques d'athéromatose se développent sans raison apparente à certains endroits des artères et non sur la surface entière des vaisseaux sanguins. Comment expliquer cette inégale répartition si ce n'est par une cause locale tissulaire prenant le pas sur le facteur humoral ?

Ces constatations pourraient faire douter de l'importance du métabolisme lipidique dans la genèse et la progression de l'athéromatose. Les recherches expérimentales menées sur l'animal feront tomber ces doutes.

Dès 1925, ANITCHKOFF, a montré que le Lapin soumis à un régime riche en cholestérol présente une athéromatose et que le développement de la lésion est lié à l'hypercholestérolémie d'origine alimentaire.

Les expériences répétées sur des animaux plus proches de l'Homme dans leur métabolisme lipidique, ont donné des résultats semblables.

En 1956, FILLIOS, ANDRUS et collab. (32) ont réalisé, chez le Rat, un syndrome humoral analogue à celui de l'athérosclérose : augmentation

du cholestérol sérique et des β lipoprotéines, en donnant un régime riche en cholestérol et contenant du thiouracile.

31 jours après le début du régime, on pouvait voir à l'autopsie, des lésions vasculaires principalement sur la crosse aortique et sur les valvules.

La même année, sur un singe adulte, MANN et ANDRUS (57) ont obtenu une hypercholestérolémie et une élévation des β lipoprotéine grâce à un régime riche en cholestérol et en graisses. A l'autopsie, on a découvert une athérosclérose de l'aorte et de ses principales branches. Les coronaires et les vaisseaux cérébraux étaient aussi le siège de lésions importantes offrant beaucoup de similitude avec l'athérosclérose humaine.

Il serait fastidieux d'énumérer ici toutes les expériences du même genre réalisées sur différents animaux.

Citons seulement encore pour mémoire celles très connues de POLLAK sur le Lapin (65) et celles de PETERSON sur le Poulet (64). Toutes aboutissent à une athéromatose induite par un régime riche en cholestérol.

L'unanimité des faits expérimentaux, ajoutée aux données biologiques souvent relevées chez l'homme athéroscléreux, plaide en faveur d'un rôle actif et important du cholestérol. Elle explique que nombre de chercheurs se soient attachés à trouver des moyens de faire baisser l'hypercholestérolémie.

On ignore encore actuellement la nature du système complexe qui règle la cholestérolémie.

Quoiqu'il en soit, la biosynthèse, la destruction du cholestérol, l'apport cholestérolique exogène jouent un rôle important.

Dans ce travail, nous avons étudié les facteurs qui interviennent dans l'absorption intestinale du cholestérol exogène.

HISTORIQUE

Les premières expériences d'inhibition de l'absorption intestinale du cholestérol ont été faites à l'aide des stérols de soja.

Maintes fois répétées, avec ce corps et avec d'autres antagonistes, et selon des processus plus ou moins variés, elles ont suscité de nombreuses controverses qui ne sont d'ailleurs pas terminées.

Nous allons brièvement rappeler ici, les expériences désormais "classiques" des précurseurs de cette technique.

C'est PETERSON, qui en 1951 (63), expérimente le premier l'action des stérols de soja sur la cholestérolémie du Poulet :

un groupe d'animaux témoins reçoit un régime de base additionné de cholestérol dissous dans de l'huile de coton tandis qu'un autre groupe reçoit avec le même régime de base, de l'huile de coton contenant en plus du cholestérol, des stérols de soja.

Après 5 à 10 semaines de ce traitement, les animaux du lot témoin présentent une hypercholestérolémie due à la surcharge alimentaire en cholestérol, tandis que les animaux ayant reçu conjointement des stérols de soja n'accusent pas les mêmes élévations de cholestérolémie.

L'auteur pense qu'un ou plusieurs des constituants du mélange des stérols de soja interfèrent sur l'absorption intestinale du cholestérol.

L'année suivante, PETERSON tente avec MICHOLS et SHNEOUR, (64) une expérience analogue. Il étudie les variations de la cholestérolémie sur 3 lots de poulets recevant respectivement :

- le 1er lot : un régime de base
- le 2e lot : le régime de base additionné de 1%
de cholestérol
- le 3e lot : le régime de base auquel s'ajoutent :
(1% de cholestérol
(
(1,3% de stérols de soja

Alors que le cholestérol sérique du premier lot reste normal, celui du second lot augmente, atteint un maximum vers la 10ème semaine de régime pour redescendre ensuite et se stabiliser à la 16ème semaine à un taux bien supérieur à la normale donnée par le premier lot.

Dans le troisième lot, on note une légère hypercholestérolémie par rapport au lot témoin, mais les chiffres enregistrés restent au-dessous de ceux du second lot. Les animaux ont donc été protégés de l'hypercholestérolémie expérimentale par l'adjonction à leur régime des stérols du soja.

En 1953, DREISBACH, BROWN, MYERS et CUTTING (25) tentent d'enrayer l'hypercholestérolémie provoquée chez des lapins par un régime contenant 1% de cholestérol, en ajoutant à ce régime 1% de stérols de soja. Les efforts des auteurs demeurent vains. Le cholestérol sanguin s'est élevé, même en présence de stérols de soja.

Pourtant, la même année, POLLAK (65) obtient, lui, des résultats satisfaisants sur des lapins. Il emploie, comme antagoniste, le principal stérol du soja : le sitostérol, dont il administre jusqu'à 7 grammes par jour pour 1 gramme de cholestérol.

Du même coup, l'auteur explique l'échec de DREISBACH : s'il donne, lui aussi, 1 gramme de sitostérol pour un gramme de cholestérol, ses animaux présentent à l'autopsie de grosses lésions athéroscléreuses tandis que s'il augmente le rapport sitostérol dans la ration journalière, il ne retrouve plus cholestérol ces lésions.

D'après lui, une dose six fois plus élevée de sitostérol

que de cholestérol est nécessaire pour une prévention efficace.

Nous avons vu que, dès ses premières expériences, PETERSON a émis l'opinion qu'un constituant du mélange des stérols de soja interfère peut-être sur l'absorption intestinale du cholestérol.

Pour confirmer cette hypothèse, l'auteur réalise, en 1953, avec HERNANDEZ, CHAIKOFF et DAUBEN (43), une élégante démonstration : vingt rats, ayant reçu auparavant un régime synthétique équilibré et non délipidé, sont traités de la manière suivante :

une canule destinée à récolter la lymphe est placée dans le canal thoracique des animaux. Un repas-test leur est administré par tubage gastrique et la lymphe est recueillie durant les 48 heures suivantes. Les animaux ont été divisés en deux séries comprenant chacune trois lots :

- Dans la première série :

- un lot témoin reçoit 4 mg de cholestérol $-4-C^{14}$ dissout dans 0cm3,25 d'huile de coton.

- le second lot reçoit le même repas-test que les témoins, mais auparavant on lui a administré par tubage, 4 mg de stérols de soja dans 0cm3,25 d'huile de coton.

- le troisième lot, reçoit lui, avant son repas-test 25 mg de stérols de soja dans 0cm3,25 d'huile de coton.

- Dans la seconde série :

- trois lots de rats reçoivent le même repas-test que dans la première série, mais pour le second et le troisième lots, les ingestions préalables d'antagonistes sont constituées respectivement de 4 et 25 mg de sitostérol dissous dans 0,25 cm3 d'huile de coton.

Les résultats sont nets. Sous l'influence des stérols de soja et du β -sitostérol, il y a une baisse marquée du cholestérol $-4-C^{14}$ retrouvé dans la lymphe, surtout lorsque le rapport antagoniste administré a été de $\frac{25}{4}$ soit $\frac{6}{1}$ cholestérol administré

Après cette expérience, les auteurs peuvent affirmer :

- d'une part que le principe actif des stérols de soja est le β -sitostérol,

- d'autre part, que ce corps agit bien au niveau de la barrière intestinale, en empêchant une résorption normale du cholestérol.

En 1954, ROSENMAN, BYERS et FRIEDMAN (67) répètent cette expérience sur le Rat. A la différence des auteurs précédents, ils n'emploient pas d'isotope radioactif et les doses administrées par animal sont de 100 mg pour le cholestérol et de 100 ou 500 mg pour le sitostérol. Les résultats sont négatifs, la teneur en cholestérol de la lymphe est sensiblement la même chez tous les animaux traités.

Dans des expériences de longue durée, les auteurs ne notent pas plus d'effet des stérols de soja contre l'hypercholestérolémie chronique du Rat induite par un régime alimentaire adéquat.

Ceci amène HERNANDEZ et CHAIKOFF (44) à refaire en 1954, l'expérience qu'ils avaient déjà réalisée avec PETERSON. Mais ils emploient cette fois, les doses de ROSENMAN et de ses collaborateurs.

Les auteurs sont catégoriques. Même en administrant 100 mg de cholestérol en un repas-test, ce qui est une grosse quantité pour un rat, ils obtiennent sous l'influence des stérols de soja une diminution de l'absorption, confirmant ainsi leurs premiers résultats.

La même année, SWELL, BOITER, FIELD et TREADWELL (78) montrent que les stérols de soja inhibent l'augmentation du cholestérol sérique de rats recevant un régime contenant 2% de cholestérol et 1% de taurocholate de sodium.

Le degré de l'inhibition s'accroît parallèlement à l'augmentation des stérols de soja dans le régime.

Les auteurs pensent que cette inhibition est le fait d'une compétition entre les différents stérols pour capter les éléments nécessaires à leur estérification.

On retiendra aussi un travail publié en 1954, par ALFIN-SIATER et collab. (1) sur le Rat et un autre publié en 1955, par BEHER et ANTHONY, (5), sur la Souris.

Les auteurs trouvent un effet inhibiteur des stérols de soja et du β -sitostérol sur l'augmentation du dépôt de cholestérol dans le foie, qui devrait normalement se produire à la suite d'un régime hypercholestérolémique.

BURKE, Mc CANDLESS et KRITCHEVSKY (11) publient en 1954 un travail similaire intitulé "Effet des stérols de soja sur le dépôt du cholestérol C^{14} dans le foie".

Les résultats concordent avec ceux des auteurs précédents. Leur recherche est, en plus, étoffée d'une mesure de la radioactivité retrouvée dans la fraction non saponifiable des fèces.

Les données obtenues permettent de conclure à une moins bonne absorption du cholestérol dans le cas où le rat a reçu des stérols de soja en même temps que du cholestérol.

Nous ne voudrions pas clore cette analyse des principales publications qui jalonnent "l'histoire" du sitostérol sans faire état maintenant d'un important travail réalisé en 1956, au laboratoire de chimie biologique de la Faculté de Médecine par notre Maître, Mr le Professeur WOLFF en collaboration avec Mr. BRIGNON(95)

Dans le cadre d'une étude de la résorption intestinale du cholestérol chez le Lapin, les auteurs constatent que l'administration, à dose unique, des stérols en solution huileuse ou en émulsion produit un hypercholestérolémie maxima, 24 heures après l'ingestion. Ils pensent alors que l'étude de cette hypercholestérolémie provoquée peut permettre d'établir un test de l'absorption intestinale du cholestérol chez le Lapin.

Ayant établi les normes de ce test, les auteurs en comparent les résultats aux chiffres obtenus quand ils font ingérer à l'animal des stérols de soja, en même temps que du cholestérol et suivant diverses proportions.

On voit que les antagonistes ne parviennent à tempérer la montée du cholestérol que lorsqu'ils sont employés dans la proportion de 4/1 par rapport au cholestérol, et ils suppriment toute tendance à l'hypercholestérolémie lorsque ce rapport atteint 6/1.

Ces résultats concordent avec ceux fournis par les épreuves alimentaires de longue durée faites sur le Lapin, telles les expériences de POLLAK.

Le mode opératoire employé ici a l'avantage d'être extrêmement rapide puisqu'au lieu d'obliger à une attente durant des semaines pour obtenir le résultat d'un régime alimentaire, il donne, dès le lendemain, la réponse à la question posée.

Nous avons exposé les faits les plus marquants relevés jusqu'au moment où nous entreprenons notre travail.

Il est incontestable que le sitostérol inhibe la résorption intestinale du cholestérol.

Le but du travail que nous exposons, ci-après, est d'étudier l'absorption intestinale du cholestérol, de la mesurer à l'aide d'un test, puis d'appliquer ce test à l'essai des éventuelles propriétés inhibitrices de divers composés.

Parmi ceux-ci, plusieurs ont été préparés au laboratoire et nous n'en possédons que de très petites quantités (500 mg). Notre test est donc subordonné à une condition essentielle : la mise en oeuvre de quantités restreintes de produits.

La technique sur le Lapin mise au point par Mr. le Professeur WOLFF ne peut être utilisée ici, bien qu'elle soit rapide et excellente.

Le traitement du Lapin demande des doses d'antagonistes de l'ordre de plusieurs grammes.

Par contre, notre recherche est facilitée par l'emploi du cholestérol 4-C¹⁴.

L'isotope marqué peut nous permettre de saisir des opérations biochimiques masquées ou difficiles à évaluer avec les moyens d'investigation ordinaires.

Dans un exposé préliminaire, nous détaillons les techniques opératoires nécessaires à l'isolement et à la mesure des lipides et du cholestérol, tout particulièrement celles rendues nécessaires par l'emploi du corps radioactif.

Grâce à ces méthodes, nous pourrons étudier l'absorption intestinale du cholestérol.

1/ "in vitro", en mettant des fragments d'intestins de rats au contact d'une émulsion contenant du cholestérol seul ou du cholestérol additionné de sitostérol. C'est l'objet de la première partie.

2/ Au-delà de la barrière intestinale. Dans une seconde partie,

nous calculerons le pourcentage de cholestérol^{4-C¹⁴} déposé dans le foie de souris après ingestion d'une dose de cholestérol additionné ou non de sitostérol.

3/ Par une évaluation des bilans fécaux chez des rats.

Cette troisième partie, nous permettra d'avoir une vue plus complète du sort du cholestérol alimentaire.

Elle donnera un test satisfaisant de l'absorption intestinale du cholestérol.

4/ Dans une quatrième partie, nous appliquerons le test précédent à l'étude des propriétés de plusieurs composés stéroliques. Nous évaluerons leur action inhibitrice sur la résorption intestinale du cholestérol par comparaison à celle exercée par le sitostérol.

LES TECHNIQUES

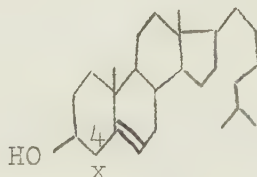
Nous allons exposer ici les techniques utilisées couramment au cours de ce travail. Quelques procédés particuliers seront traités en même temps que les chapitres auxquels ils se rapportent.

I - ESSAIS PRELIMINAIRES IMPOSES PAR L'EMPLOI DE L'ELEMENT MARQUE -

I°/ La source de radioactivité

Dans toutes nos recherches, nous avons utilisé du cholestérol 4- C^{14} .

Chimiquement, il est semblable au cholestérol ordinaire. C'est un stérol dont la formule brute est $C_{27}H_{46}O$ et la formule développée :



Il possède une fonction alcool en 3 et une double liaison en 5-6.

La particularité est d'avoir eu le carbone de la position 4 remplacé par un isotope radioactif, le carbone 14.

Ce carbone a une période de 5.568 ans et émet des rayons β mous.

Le cholestérol radioactif nous a été fourni par "The radio-chemical Centre", Amersham, England.

Il a été préparé par la méthode de GALLAGER et BELLEAU (J. Amer. Chem. Soc. 1951 - 73 - 4458) à partir de la cholesténone 4-C¹⁴ (Fujimoto - J. Amer. Chem. Soc. 1951 - 73 - 1856). Il a été purifié par précipitation à la digitonine et par chromatographie sur alumine.

Nous avons utilisé plusieurs échantillons successifs reçus :

- au début, sous forme cristallisée
- puis dissous dans du benzène

Dès leur réception, ces échantillons ont été dissous ou dilués dans de l'alcool absolu et amenés à une concentration d'environ 500.000 coups/min./cm³.

Ceci afin d'éliminer les possibilités d'auto-destruction. Les solutions ont été ensuite conservées au réfrigérateur.

2°/ L'appareil de mesure de
la radioactivité

est composé :

- d'un compteur Geiger sans fenêtre, à débit gazeux (hélium 99,05 % - isobutane 0,95 %) du type "SC 16, Windowless Flow Counter" et de mouvement propre faible puisque voisin de 30 coups à la minute.
- d'un préamplificateur "Tracerlab P₁₀"
- d'un intégrateur "SC - 33 1.000 Scaler Tracerlab" muni d'une minuterie permettant de compter les échantillons durant un temps prédéterminé.

Les produits dont on veut mesurer la radioactivité sont déposés sur des cupules d'aluminium rondes, de dimensions toujours identiques.

Les comptages sont faits à potentiel constant (1250 volts).

Il est indispensable d'éviter l'entrée dans le compteur sans

fenêtre de toute trace d'air; de ce fait, la cupule est introduite par l'intermédiaire d'un sas dont on purge l'air par un courant d'hélium (hélium = 99,05 % - isobutane : 0,95 %) à raison de 15 bulles par seconde durant 15 secondes, dans le barboteur.

A l'intérieur du compteur, durant les mesures, on entretient en permanence, une légère pression d'hélium : 1 bulle par seconde dans le barboteur.

3°/ La précision statistique

Sur les mesures de radioactivité, elle est telle que nombre de coups N enregistrés est connu à $\sqrt{N}$ près.

D'une manière générale, nous avons laissé nos échantillons dans le compteur durant le temps nécessaire pour obtenir un nombre de coups N voisins de 2.500 - la précision des mesures est alors de 2 %.

Dans ces conditions, le nombre de coups par minute correspondant à l'échantillon compté est donné par :

$$n = \frac{N \pm \sqrt{N}}{t} - m_p$$

où (t : représente le temps mis par le compteur pour enregistrer 2.500 coups.
(
(m_p : représente le mouvement propre de l'appareil
(
(N : le nombre de coups enregistrés par l'appareil
(
(n : le nombre de coups par minute de l'échantillon

4°/ Reproductibilité des résultats

Nous avons étudié les conditions optima à respecter pour obtenir des résultats constants.

Dans ce but, des essais ont été faits avec notre solution

de cholestérol $4-C^{14}$ diluée, déposée sur cupules d'aluminium et évaporée.

Plusieurs facteurs interviennent, ce sont notamment :

a/ les conditions d'évaporation

Toutes les opérations chimiques que nous menons dans nos expériences aboutissent à l'obtention d'une solution radioactive dont il est nécessaire de mesurer l'activité.

Cela ne peut se faire en milieu liquide, pour deux raisons :

- à cause du modèle d'appareil utilisé
- d'autre part, parce qu'il s'agit de rayons β mous. Toute trace d'impureté aurait pour effet d'altérer le résultat du comptage par absorption.

Il est indispensable de préparer des échantillons secs.

Le solvant étant toujours organique : le plus souvent chloroforme ou alcool méthylique, nous laissons les solutions s'évaporer à l'air libre. Faite lentement, cette opération assure d'ailleurs des dépôts réguliers, tapissant bien le fond des cupules.

Or, nous avons remarqué que la position du dépôt a énormément d'importance.

Lorsqu'on n'a pas pris soin d'assurer une horizontalité parfaite à la cupule avant d'y verser la solution, le résidu d'évaporation tend à se déposer plus abondamment à un endroit de la cupule. Nous avons pu vérifier que, dans ce cas, le nombre de coups enregistrés pour la même cupule varie suivant l'orientation qu'on lui donne dans le sas.

Nous indiquons dans le tableau suivant le nombre de coups obtenus pour les différentes positions (rotation d'un quart de tour dans le compteur) de 2 cupules dont l'une A a été évaporée sur une surface horizontale et l'autre B, sur une surface non horizontale.

N théorique	cupule A tournée de =				Cupule B tournée =			
3.500 cc/alk.	0°	90°	180°	270°	0°	90°	180°	270°
	3548	3560	3480	3525	3730	3215	3840	3350

Les écarts entre les valeurs mesurées sont beaucoup plus grands pour la cupule B que pour la cupule A.

Dans la mesure des rayons β , le mode de préparation de la cupule est donc très important.

Pour éliminer cette cause d'erreur, toutes les cupules comptées dans nos expériences sont posées durant l'évaporation sur une plaque de verre à vis calantes réglables. Nous en contrôlons l'horizontalité, avant chaque opération, à l'aide d'un niveau d'eau.

b/ les conditions de dessiccation.

Après évaporation du solvant, les résidus peuvent être empreints d'une humidité variable.

Nous avons remarqué des différences dans des comptages faits à 24 heures d'intervalle sur les mêmes échantillons.

Aussi, nous avons jugé utile d'étudier l'influence du degré de dessiccation des échantillons sur la radioactivité mesurée.

Sur la plaque horizontale, nous préparons deux cupules recevant chacune 1 cm³ de la même solution.

Deux heures après évaporation du solvant, les cupules sont passées au compteur. Pour chacune d'elles, deux mesures sont faites.

Puis, elles sont placées dans un dessiccateur à P₂O₅ durant 16 heures.

D'après le tableau qui suit, on peut voir que les valeurs trouvées sont très voisines de la radioactivité théorique introduite dans chaque cupule.

On peut aussi constater qu'après 48 heures de séjour au dessiccateur, les résultats n'ont pas changé. Ils sont identiques à ceux trouvés pour 16 heures.

	Radioactivité théorique	Cupules non déshydratées	Cupules laissées 16h. à P_2O_5	Cupules laissées 48h. à P_2O_5
Cupule I	3.500	2.130	3.567	3.499
		2.333	3.514	3.550
Cupule II	3.500	2.554	3.527	3.542
		2.490	3.488	3.518

Nous pouvons en conclure que la présence d'humidité diminue très sensiblement le nombre de coups enregistrés par absorption de rayons β .

Il est nécessaire d'opérer sur des échantillons totalement déshydratés.

Pour ce faire, les cupules seront toujours mises 16 heures dans un dessiccateur à P_2O_5 avant les comptages.

c/ corrélation entre la dose de cholestérol $4C^{14}$ employée et le nombre de coups enregistrés par le compteur.

Avant d'utiliser le produit marqué dans nos expériences, il nous a semblé bon de voir si à des doses croissantes de cholestérol $4C^{14}$, correspondait bien une augmentation parallèle de la radioactivité mesurée.

Sur quatre cupules, nous déposons respectivement :

0,6 cm³

1 cm³

1,5 cm³

2 cm³ de solution de cholestérol- 4-C^{14} .

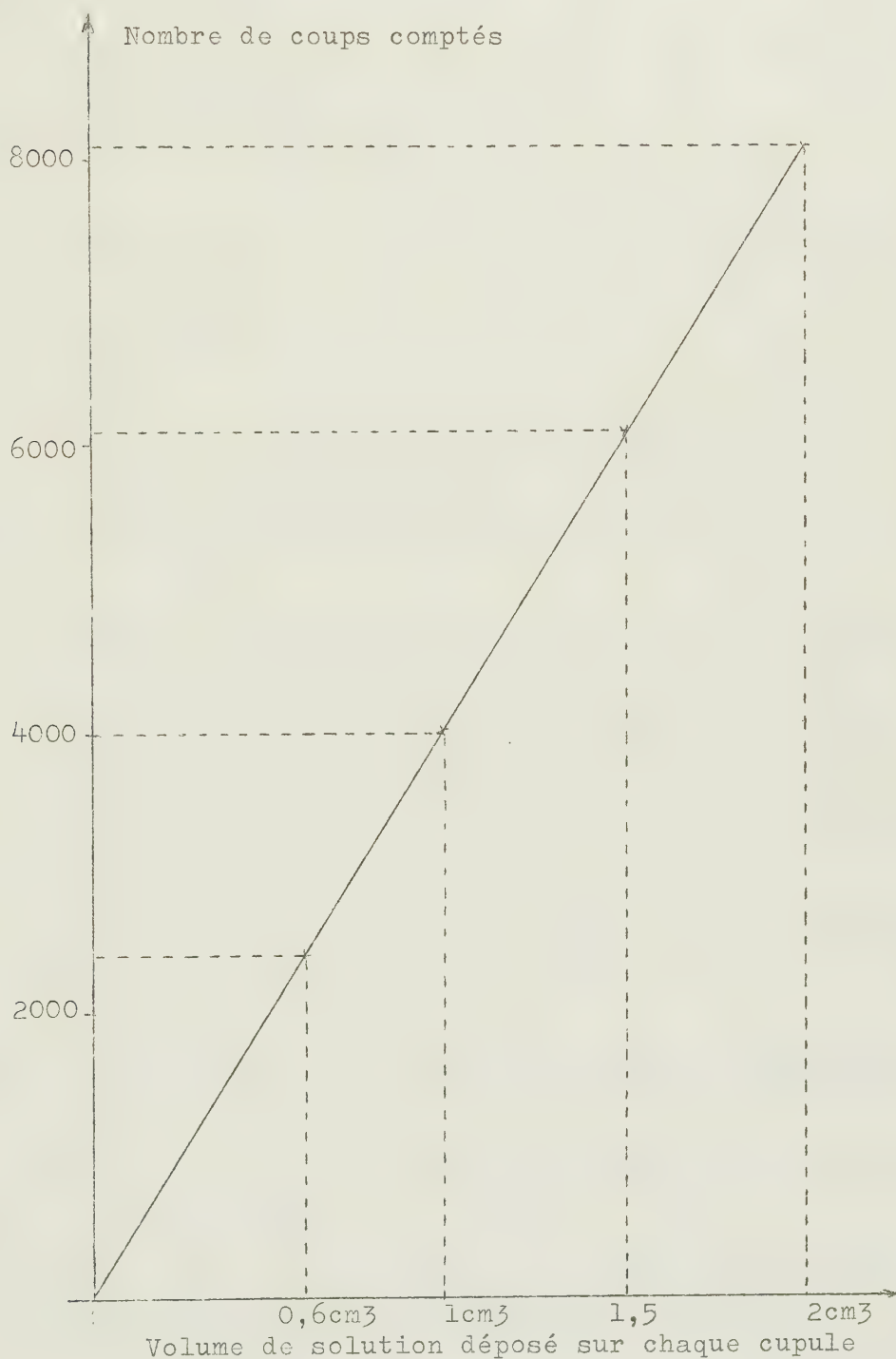
Après évaporation et dessiccation, les échantillons obtenus sont passés au compteur. Deux mesures sont faites pour chacun d'eux.

Nous indiquons dans le tableau suivant la radioactivité de chaque cupule (nombre de coups comptés en 10 minutes, mouvement propre déduit) en regard du volume de solution de cholestérol- 4-C^{14} déposé :

Quantité de cholestérol- 4-C^{14} déposé sur les cupules	Nombre de coups, comptés en 10' par le compteur, MP déduit		
0,6 cm ³	2.420	-	2.435
1 cm ³	4.020	-	4.008
1,5 cm ³	6.053	-	6.088
2 cm ³	8.071	-	8.044

A partir de ces données, nous avons établi un graphique (graphique n° I).

- Graphique n° I -



Nous pouvons ainsi affirmer qu'il y a corrélation linéaire entre la dose de cholestérol 4-C¹⁴ employée et le nombre de coups enregistrés par le compteur.

Nous pouvons ainsi affirmer qu'il y a corrélation linéaire entre la dose de cholestérol $4C^{I4}$ employée et le nombre de coups enregistrés par le compteur.

II - ISOLEMENT ET DOSAGE DES PRODUITS RADIOACTIFS -

Travaillant soit "in vitro", sur un organe isolé, soit "in vivo", sur l'animal entier, il nous a fallu, à la fin de l'expérimentation, extraire des tissus :

- d'abord la fraction lipidique globale où parmi des corps sans intérêt pour nous, se trouvaient du cholestérol $4C^{I4}$ et des produits radioactifs dérivant de la transformation du stérol marqué employé au départ.

- puis, dans la fraction lipidique elle-même, nous avons du mettre en évidence le seul cholestérol $4C^{I4}$ non transformé.

Plusieurs opérations successives ont été nécessaires:

- saponifier les tissus et de l'hydrolysate obtenu, extraire les lipides.
- doser les lipides totaux radioactifs.
- isoler des lipides totaux, le cholestérol afin d'évaluer la radioactivité dont ce corps est responsable.

A/ SAPONIFICATION DES TISSUS ET EXTRACTION DES LIPIDES TOTAUX.

Les méthodes les plus couramment utilisées jusqu'à présent étaient très laborieuses.

Après 4 à 24 heures d'hydrolyse à reflux par la potasse alcoolique, on devait employer successivement d'importants volumes

d'éther de pétrole pour assurer une extraction complète des lipides. Après cela, il était encore nécessaire de laver les extraits avec des produits alcalins et acides, puis de les concentrer par distillation afin de les ramener à un volume facilement maniable pour les opérations chimiques ultérieures. (CHAIKOFF et TOMKINS (14) - LIPMAN et KLEIN (56) - CHAIKOFF et HOTTA (15)).

Nous avons laissé de côté ces techniques pour n'utiliser que celle de CHAIKOFF et Coll. (BARUCH et CHAIKOFF (3) - CHAIKOFF, HOTTA et HILL (16) infiniment plus rapide et plus simple.

a/ La saponification

Les fragments de tissus (pour nous, foie ou intestin) doivent peser environ 500 mg et être finement lacérés.

On les place au fond de petits erlens de 50 cm³ en ayant soin de ne pas laisser de nombreux débris sur le col ou les parois du récipient.

On recouvre d'environ 8 à 10 cm³ d'alcool à 95° et on ajoute pour assurer l'hydrolyse :

: 2 cm³ d'une solution d'éthylate de sodium préparée extemporanément selon les proportions de 250 mg de Na dans 10 cm³ d'alcool à 95 °.

On agite afin d'assurer une bonne dispersion des morceaux d'organes dans le liquide.

Les erlens sont bouchés par des boules de verre soufflé, destinées à réduire l'évaporation, puis placés sur un bain de vapeur durant 40 minutes.

Nous avons été amenée à constater :

- qu'il ne faut jamais laisser plus de quelques minutes les morceaux d'organes au contact de l'alcool seul, avant d'ajouter la solution d'éthylate de sodium, sinon, les morceaux durcissent et sont beaucoup plus longs à saponifier.

- l'éthylate de sodium pour être actif doit toujours être préparé extemporanément.

- On doit prendre soin d'agiter fréquemment les erlens, surtout au début de l'hydrolyse, sinon les tissus s'agglomèrent au fond du récipient, ne sont pas bien pénétrés par les liquides et mettent plus longtemps à se réduire.

Les auteurs signalent qu'on peut rajouter un peu d'alcool si le volume de liquide diminue notablement au cours de la saponification.

Après 40 minutes, l'hydrolyse est terminée. Les tissus doivent s'être dissous dans le liquide ou ne plus laisser qu'un résidu poudreux.

On ajoute 3 cm³ d'eau distillée.

En général cette addition fait disparaître le petit résidu de tissus qui pouvait persister et clarifie l'hydrolysate.

On continue à chauffer, en enlevant les bulles de verre, pour chasser par évaporation toute trace d'alcool.

b/ l'extraction des lipides

C'est une opération simple.

Retiré du bain de vapeur, l'erlen est rapidement refroidi sous un courant d'eau.

- On acidifie l'hydrolysate avec SO_4H_2 , 5 N, en présence de vert de bromocrésol (virage du bleu vert au jaune, correspondant à pH 4).

On ajoute 10 cm³ de chloroforme très exactement mesuré.

- On ferme l'erlen à l'aide d'un bouchon de caoutchouc recouvert d'une feuille de cellophane, puis, après s'être assuré de l'étanchéité du système, on agite vigoureusement durant 5 minutes.

L'extraction est terminée.

Le contenu de l'erlen est transféré dans un tube à centrifuger de 20 cm³.

Peu importe que ce transfert soit quantitatif ou non, lipides et stérols sont dans la phase chloroformique dont on n'utilisera qu'une partie aliquote des 10 cm³ du début.

- On centrifuge 10 minutes à 2.500 tours/minute.

La centrifugation sépare le contenu du tube en une phase chloroformique, contenant stérols et lipides, surmontée d'une phase aqueuse contenant les corps solubles dans l'eau.

La séparation est matérialisée par une pellicule plus ou moins épaisse, réunissant des produits insolubles dans les deux phases.

- Avec une seringue munie d'une longue aiguille hypodermique, on soutire la solution chloroformique.

Sur cette solution, seront faits le dosage des lipides totaux puis l'isolement du cholestérol.

Avant d'aller plus loin, il est indispensable de noter que nous avons vérifié deux points :

- en une seule fois, le chloroforme extrait la totalité des lipides, alors que la technique à l'éther de pétrole nécessite plusieurs extractions.

Ici, une seconde agitation du liquide aqueux acide avec du chloroforme n'extrait plus rien.

Une solution d'acides gras et de cholestérol-¹⁴C₄ soumise à deux extractions successives donne pour résultat :

dans l'extrait n° 1 = 3.050 cpm/cm³

dans l'extrait n° 2 = 32 cpm/cm³ soit
à peu près le mouvement propre.

- L'extraction au chloroforme est sélective :

A des extraits de tissus ne contenant pas de corps lipidiques radioactifs, nous ajoutons un peu d'acétate - I - C¹⁴.

Nous faisons une extraction chloroformique.

1 cm³ de la solution, mis sur cupule, présente une radio-

activité de 29 coups/minute c'est-à-dire juste le mouvement propre de l'appareil.

Le chloroforme ne s'est pas chargé du corps soluble dans l'eau.

B - MESURE DES LIPIDES TOTAUX RADIOACTIFS -

L'évaluation en est faite directement sur l'extrait chloroformique.

De cet extrait, nous prélevons 1 ou 2 cm³ représentant donc 1/10^{ème} ou 1/5^{ème} de la prise d'essai initiale, sur des cupules d'aluminium.

Les cupules ont été auparavant tarées à la semi-microbalance après un séjour de 16 heures au dessicateur à P₂O₅.

Elles sont posées sur la plaque horizontale dont nous avons vérifié l'horizontalité avant les prélèvements.

Nous laissons à l'air libre jusqu'à évaporation totale puis nous assurons une parfaite dessiccation en plaçant les échantillons au dessicateur à P₂O₅ durant 16 heures.

Les cupules sont ensuite :

- passées au compteur pour déterminer l'activité des lipides totaux.

- pesées à la semimicrobalance afin de fournir par différence avec les tares, le poids de résidu.

En raison de l'autoabsorption très sensible dans le cas des rayons β , la radioactivité transmise par les échantillons ne correspond qu'à une partie de la radioactivité réellement présente.

De ce fait il a été nécessaire d'établir une courbe de self-absorption permettant la correction de tous les résultats lus au Windowless en fonction du poids du résidu lipidique sur la cupule.

Etablissement d'une courbe d'autoabsorption des lipides
à C₁₄.

Nous avons adopté la technique suivante :

- une solution radioactive, ici du cholestérol 4-C^{14} , est uniformément répartie (1160 cp/m) sur des cupules d'aluminium tarées.

Après évaporation, nous ajoutons dans chaque cupule des quantités croissantes d'un extrait chloroformique provenant de l'extraction des lipides d'un organe non radioactif (animal normal non traité).

Après évaporation du solvant et dessiccation, comme il est prévu dans nos expériences habituelles, les cupules sont pesées et mises au compteur.

A chaque poids de résidu correspondent deux cupules. La radioactivité introduite au départ, étant la même pour tous les échantillons, il est facile de voir quel est le pourcentage de radioactivité retrouvée en fonction du poids du dépôt et partant de là, d'établir une courbe d'autoabsorption.

Dans le tableau n° 2 nous indiquons :

P = poids en milligrammes du résidu de lipides totaux.

n = Radioactivité effectivement mesurée au compteur, en nombre de coups par minute, mouvement propre déduit.

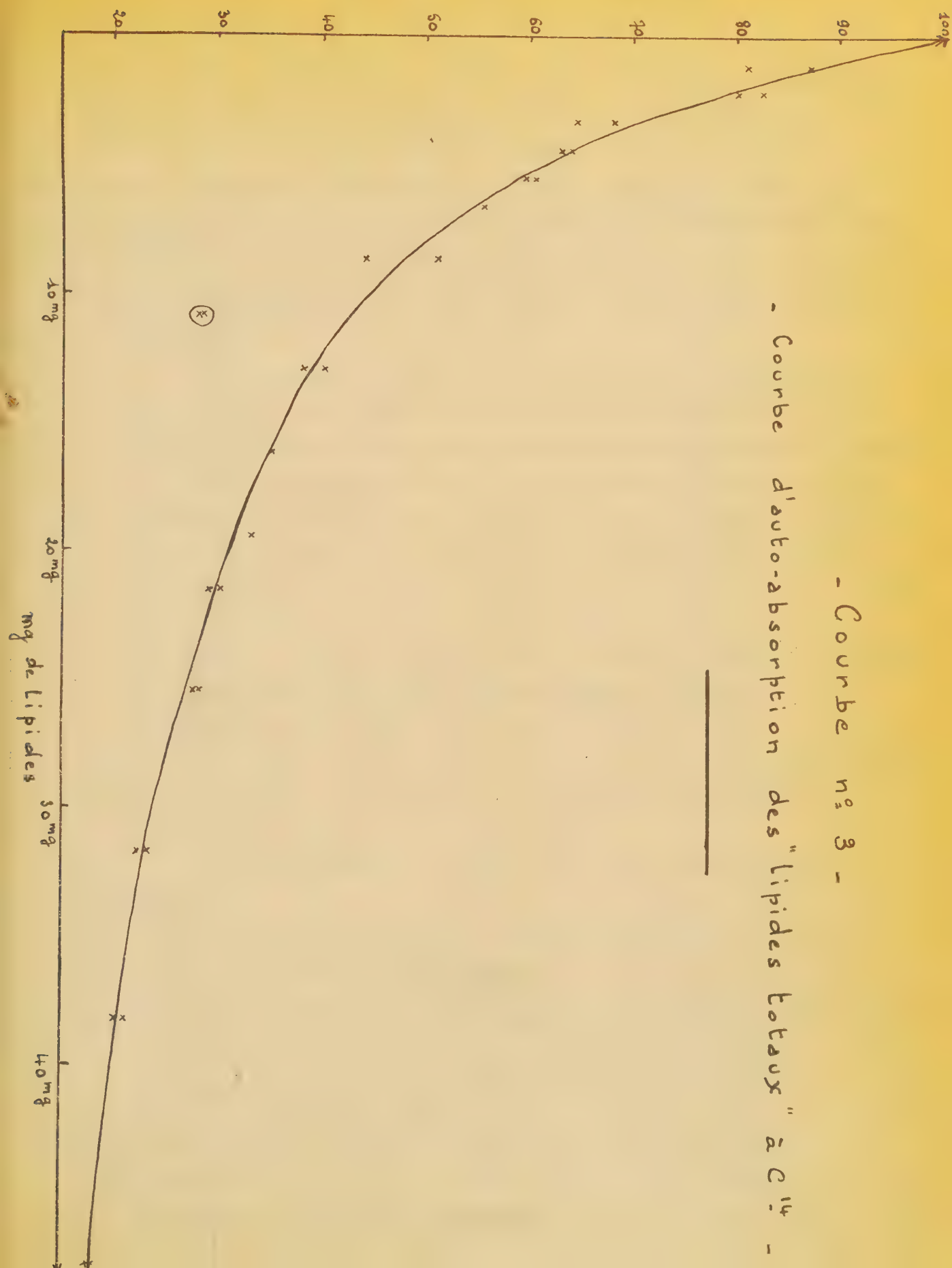
% = Pourcentage de radioactivité retrouvée.

- TABLEAU N° 2 -

	P	n	%
Radioacti- vité in- troduite: 1160 cps/min.	1mg,07	1004 936	87 81
	2,14	955 922	82,5 80
	3,30	745 791	64,5 68
	4,40	729 737	63 64
	5,50	702 691	60,5 59,5
	6,60	643	55,5
	8,64	510 590	44 51
	10,87	328 322	28,5 } ? 28
	13	441 468	38 40
	16,21	402 409	35 35
	19,45	385	33
	21,62	350 330	30 29
	25,5	322 312	28 27,5
	31,87	258 264	22 23
	38,24	243 231	21 20
	47,8	204 201	18 17,5

% de radioactivité transmise.

- Courbe n° 3 -
- Courbe d'auto-absorption des "lipides totaux" à C^{14} -



Ces résultats sont reportés sur un graphique, représentant le pourcentage de radioactivité du C^{14} qui est effectivement compté en fonction du poids du dépôt de lipides. (courbe n° 3)

Dans nos expériences, les cupules ayant été tarées, puis pesées après dessiccation, nous connaissons le poids du dépôt de lipides. Il nous est facile de chercher sur la courbe d'autoabsorption quel pourcentage de la radioactivité réelle est retrouvé par le compteur dans ce cas particulier et d'appliquer la correction adéquate.

Il est bon de souligner encore une fois l'importance de la dessiccation. Nous avons vu, au début de cet exposé, que la radioactivité mesurée pouvait varier énormément avec le degré d'humidité.

Ici, la pesée du résidu (il est souvent de quelques milligrammes) conditionne les corrections de self-absorption. C'est une raison essentielle pour que la dessiccation soit faite dans les mêmes conditions pour tous les échantillons et qu'elle soit totale.

On pourrait nous poser cette question :

nos pesées, qui sont sensibles puisque nous apprécions le 1/100ème de milligramme, sont-elles vraiment reproductibles et peut-on réellement se fier à un tel facteur de correction ?

Pour voir si notre dessiccation est suffisante après 16 heures et surtout pour voir si les chiffres obtenus sont reproductibles, nous pesons deux fois les mêmes cupules :

- d'abord après un séjour de 16 heures au dessiccateur à P_2O_5 ;
- ensuite après 3 jours supplémentaires au dessiccateur :

Voici les résultats :

1ère pesée	2ème pesée	différence entre les deux
5 mg,52	5 mg,49	- 0 mg,03
3 mg,88	3 mg,86	- 0 mg,02
4 mg,33	4 mg,31	- 0 mg,02
3 mg,17	3 mg,17	0

Si l'on veut bien se référer au graphique d'autoabsorption, on voit que 0mg,02 en plus ou en moins de 3mg,86 ne joue pas sur la correction que nous aurons à appliquer.

C - DOSAGE DU CHOLESTEROL -

1/ Isolement du cholestérol

Le cholestérol est précipité sous forme de digitonide.

La technique utilisée est celle de SCHOENHEIMER et SPERRY, modifiée par SPERRY et WEBB. (74)

Le mode opératoire est le suivant :

- dans un tube à précipiter droit de 15 cm³, on prélève 5 cm³ de l'extrait chloroformique contenant les lipides totaux.

Le solvant est évaporé en chauffant doucement à l'air libre ou sous vide dans une étuve à 50°.

- le résidu est dissous dans 5 cm³ d'un mélange à parties égales d'alcool absolu et d'acétone.

A cette solution, on additionne :

- (- II gouttes d'acide acétique à 10%
- (- 2,5 cm³ de solution alcoolique de digi-
- (tonine (dissolution d'1 gramme de digi-
- (tonine dans 100 cm³ d'alcool à 50% à la
- (température de 60°).

On mélange et on amorce la précipitation en frottant les parois du tube à l'aide d'un agitateur. Le tout est placé dans une jarre fermée à température ambiante durant toute la nuit. (16 heures).

Le lendemain, le précipité est décollé des parois et du fond du tube et remis en suspension.

L'agitateur enlevé, est placé sur un support numéroté.

On centrifuge les tubes pendant 15 minutes à 2.500 tours/min.

Le liquide surnageant est décanté et remplacé par :

- 5 cm³ d'acétone-éther (1-2)

(l'éther a été au préalable débarrassé de ses peroxydes).

On remet le précipité en suspension puis on centrifuge à nouveau 5 minutes à 2.500 tours/min. pour décanter la solution surnageante.

- 2 lavages sont encore faits de la même manière avec 5 cm³ d'éther, chaque fois.

Un séjour de 15 minutes à l'étuve à 37° élimine l'éther fixé sur le précipité.

On termine la dessiccation par passage des tubes au bain de sable à 100° pendant 15 minutes. Puis on met à refroidir dans un dessiccateur à P₂O₅.

Dans nos tubes se trouve alors isolé un digitonide de cholestérol débarrassé des produits saponifiables et de la digitonine en excès.

2/ Dosage du cholestérol.

Plusieurs techniques sont possibles pour évaluer le cholestérol radioactif du complexe.

- CHAIKOFF et TOMKINS (14) font une oxydation et une transformation en CO₂Ba. C'est une méthode laborieuse.

- LIPMANN et KLEIN (56) proposent, eux, une suspension du précipité dans l'éther de pétrole. Des essais faits antérieurement au laboratoire, avaient montré qu'une telle suspension est hétérogène et instable.

- Notre collègue, Madame THIAVILLE-DUBOST, après avoir tenté de mettre au point une suspension, puis une filtration du précipité avait fini par adopter, avec quelques modifications, la

- méthode de dissolution employée par CHAIKOFF et HOTTA.

Nous avons bénéficié de l'expérience de Madame THIAVILLE-DUBOST (85) et nous nous en sommes tenue à son mode opératoire.

Après refroidissement dans un dessiccateur à P_2O_5 , les tubes contenant le digitonide de cholestérol sont tarés avec leur agitateur.

On les remet à chauffer ensuite dans un bain de sable à 100° et on dissout à chaud le digitonide de cholestérol avec quelques centimètres-cubes d'alcool méthylique.

La dissolution terminée, on laisse les tubes reprendre la température ambiante et on les pèse de nouveau.

En soustrayant du poids trouvé, la tare du tube contenant le précipité sec et l'agitateur, dans les mêmes conditions de température, on obtient en grammes, la quantité d'alcool méthylique utilisée pour la dissolution du précipité.

La conversion des poids en volumes se fait simplement en pesant 2 cm³ d'alcool méthylique dans les mêmes conditions de température que les essais.

On dépose alors une partie aliquote de la solution méthylique de digitonide de cholestérol, soit 2 cm³ sur une cupule d'aluminium.

On ajoute 1 goutte de solution aqueuse de sels biliaires (0,1 mg/cm³). Cette addition a un double effet :

- l'apport d'eau à la solution alcoolique insolubilise la digitonide.

- la présence de sels biliaires, par action sur la tension superficielle, empêche la formation d'un film de digitonide qui monterait en surface, le long des parois de la cupule.

A la dose utilisée, la solution de sels biliaires ne modifie en rien le comptage. Le risque, d'ailleurs compte peu étant donné qu'on reproduit cette addition pour tous les échantillons de digitonides à mesurer.

On laisse évaporer le solvant en s'assurant évidemment de l'horizontalité des échantillons.

La dessiccation terminée, il ne reste qu'à passer les cupules au compteur pour mesurer la radioactivité de chacune.

Bien entendu, le problème de l'autoabsorption se pose, cette fois encore.

Nous avons appliqué la méthode de correction déjà employée, avant nous, par Madame THIAVILLE-DUBOST (85).

Il a été préparé par notre collègue, une série d'échantillons de digitonides de cholestérol à cholestérol C_{14} constant, mais dont la teneur en cholestérol banal passait de 0 à 1 milligramme. Ce qui ordinairement est de l'ordre de grandeur de la concentration en cholestérol de nos cupules.

Les résultats expérimentaux sont les suivants; (tableau n°4) ils ont permis à Madame THIAVILLE d'établir une courbe d'autoabsorption (n° 5) que nous reproduisons.

Dans les expériences, parallèlement à la mesure de la radioactivité, l'évaluation du cholestérol total contenu sur les cupules est faite par colorimétrie, sur une portion aliquote de la solution méthylique suivant la technique classique de SPERRY et WEBB. (74).

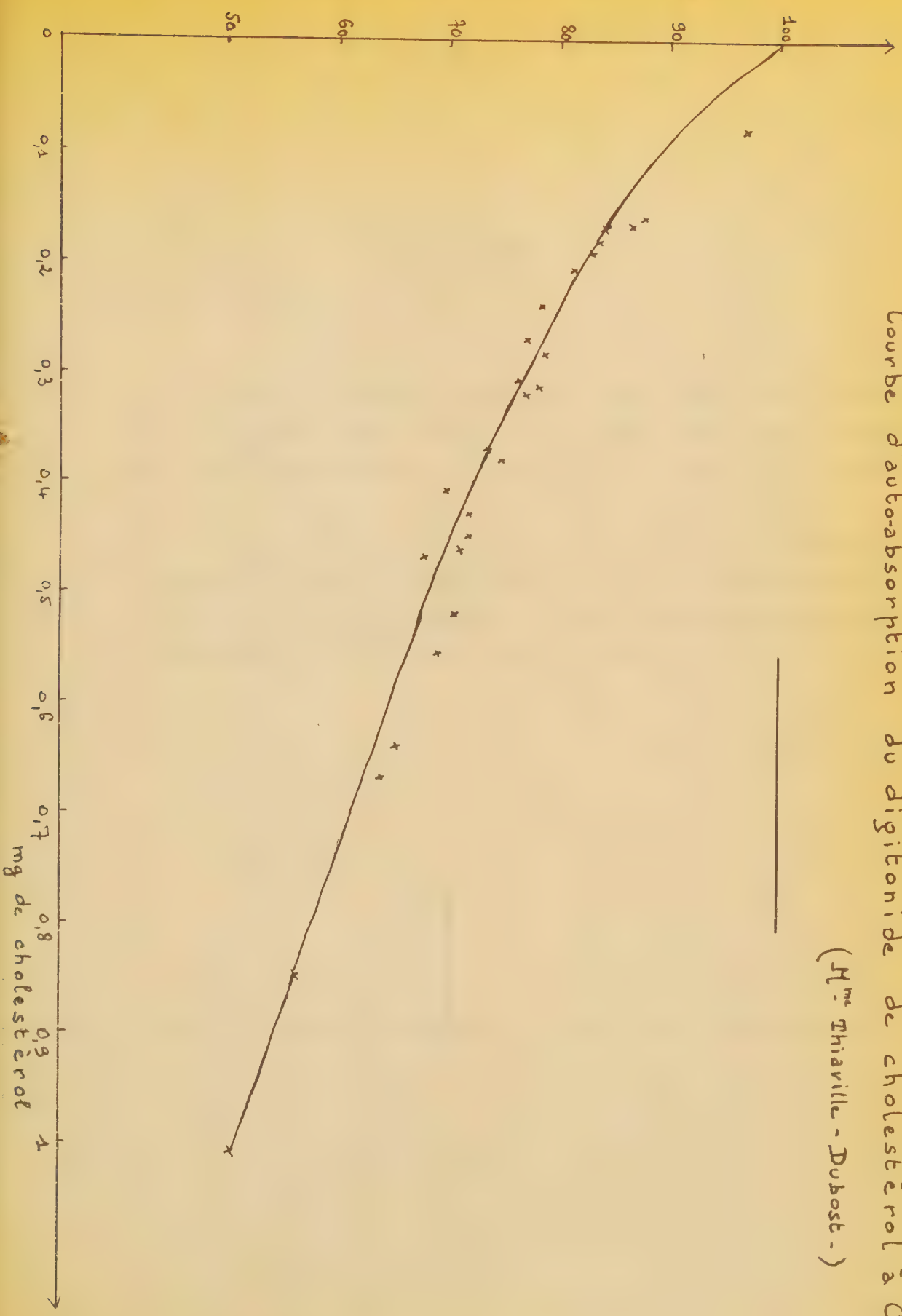
Connaissant le cholestérol total déposé sur une cupule il est facile de se référer à la courbe d'autoabsorption qui indique le pourcentage de radioactivité retrouvé dans ce cas.

- TABLEAU N° 4 -

mg de cholestérol sur la cupule	% de radioactivité retrouvée
0	100
0,08	96,8
0,16	87,6
0,168	86,4
0,17	84
0,182	83,6
0,193	82,8
0,208	81,2
0,24	78,4
0,272	77
0,285	78,7
0,308	76,3
0,314	78,2
0,322	77
0,367	73,5
0,38	74,9
0,407	68,9
0,43	71,8
0,45	71,7
0,463	71
0,469	67,7
0,522	70,5
0,557	69,1
0,642	65,3
0,67	64
0,85	56,4
1,08	50,4

- Courbe n° 5 -

Courbe d'autoabsorption du digitonide de cholestérol à C^{14}
(H^m : Thiarille - Dubost -)



CONCLUSIONS

Dans ces quelques pages, nous avons exposé les techniques qui nous permettront d'isoler et de doser les lipides totaux et tout particulièrement le cholestérol, au cours de nos expériences.

Nous nous sommes principalement attachée aux problèmes de comptage des échantillons radioactifs et à l'établissement de courbes d'autoabsorption, afin d'obtenir une mesure précise de la radioactivité retrouvée dans les tissus.

Ière PARTIE

ESSAI D'ETUDE DE LA FIXATION DU CHOLESTEROL -4-C¹⁴
PAR LA MUQUEUSE INTESTINALE "IN VITRO"

Toutes les publications citées au début de notre exposé, mettent en lumière un antagonisme sitostérol-cholestérol-s'exerçant au niveau de l'intestin.

HERNANDEZ, PETERSON et collaborateurs (43) ne retrouvent pratiquement plus de cholestérol $4-C^{14}$ dans la lymphe du canal thoracique quand ils administrent à des rats du sitostérol en même temps que du cholestérol.

De l'avis même des auteurs, les stérols des plantes auraient une interférence sur l'absorption du cholestérol.

Les chercheurs sont à peu près unanimes à penser que les stérols des plantes, peu absorbables, retiennent le cholestérol dans la lumière de l'intestin et l'empêchent de passer dans les cellules épithéliales.

Plusieurs hypothèses, expliquant le mécanisme d'action, ont même été avancées :

- concurrence entre les stérols pour les éléments nécessaires à leur estérification.

SWELL, BOITER, FIELD et TREADWELL (78) pensent que pour être absorbé, le cholestérol doit avoir subi préalablement une estérification. Les auteurs réalisent "in vitro" une expérience au cours de laquelle ils mettent en contact du cholestérol ou des stérols de soja avec de l'acide Oléique en présence d'enzyme pancréatique et de sels biliaires. Cholestérol et stérols de soja sont estérifiés, mais le cholestérol l'est un peu plus rapidement.

L'enzyme ne semble pas manifester de spécificité. Il est donc probable, concluent les auteurs, que les stérols de soja entrent en compétition avec le cholestérol à l'égard de l'enzyme, des sels biliaires et des acides gras.

Ce serait par ce mécanisme que les stérols végétaux inhiberaient l'estérification et par voie de conséquence, l'absorption du cholestérol.

Pour DAVIS, le mécanisme est tout différent (23)

Le cholestérol a une solubilité et une dispersibilité plus grande que le sitostérol et de ce fait, il est mieux absorbé.

Mais l'auteur montre que cholestérol et sitostérol peuvent se combiner pour former un complexe cristallin dont les propriétés de solubilité et de dispersibilité sont intermédiaires entre celles de chacun des composants.

L'action du sitostérol serait due à la formation de ce complexe. Le cholestérol ainsi transformé se verrait doué d'une dispersibilité amoindrie qui expliquerait la diminution de son absorption.

Ayant pris connaissance des faits et des hypothèses cités, nous avons pensé qu'en mettant l'intestin en contact avec un milieu contenant du cholestérol ou du cholestérol additionné de sitostérol, il nous serait possible de trouver dans la membrane intestinale même, des différences très nettes du taux de fixation du cholestérol.

Ce projet de travail s'accommodait très bien d'une technique "in vitro".

Chacun sait que des organes isolés sont capables de survivre et d'avoir une activité métabolique s'ils sont placés dans un milieu convenable.

Des auteurs ont fait, avant nous, des recherches "in vitro" sur l'absorption intestinale :

- WILSON et WISEMAN (94) ont utilisé des sacs retournés préparés à partir d'intestins isolés de rats pour étudier l'absorption de monosaccharides et d'acides aminés.

- Une de nos collègues, Madame VUILLEMIN-WEIS (90) a aussi employé avec profit une technique analogue dans une partie de son étude sur l'absorption intestinale de la vitamine B₁₂.

Notre choix d'une telle méthode était donc pleinement justifié.

Dans une technique "in vitro", la phase terminale de l'ab-

sorption intestinale : le transfert des éléments fixés des cellules de la muqueuse aux canaux lymphatiques ou au sang, ne peut avoir lieu facilement, dans le cas des lipides et du cholestérol. Le fait a été vérifié (SMITH, HAUKE, TREADWELL) (73). Il manque, pour ce transfert, l'effet physique produit "in vivo" par les mouvements péristaltiques et la pression, le "flux différentiel" entre les capillaires et les chylifères.

Seule la fixation du cholestérol dans la muqueuse intestinale sera donc décelable. C'est, pour nous, semble-t-il, la phase intéressante de l'absorption.

Pour ces raisons, nous avons renoncé à la préparation délicate de sacs invertis pour n'utiliser simplement que des fragments d'intestin mis dans des milieux convenables.

Pendant le temps de contact des morceaux d'intestin avec le milieu, le cholestérol de la solution peut être retenu par les cellules de la membrane. Après incubation, il suffit de laver les tissus, puis de les saponifier pour en extraire le stérol fixé physiologiquement et le doser.

Dans cette première partie, nous verrons successivement :

I - LES TECHNIQUES UTILISEES.

A - Les techniques physiologiques.

- 1 - le milieu employé pour permettre au tissu intestinal de survivre.
- 2 - le contrôle de survie
- 3 - la préparation des morceaux d'intestin
- 4 - le lavage des morceaux d'intestin après le temps d'incubation.

B - les techniques chimiques.

II - LES EXPERIENCES.

Elles seront groupées en quatre chapitres traités comme suit :

A - Mise au point d'une formule d'émulsion.

Addition à la solution de Krebs-Ringer bicarbonatée

- d'huile de coton et de sels biliaires
- d'acide oléique et de sels biliaires
- d'acide oléique, de sels biliaires, de Tween 80.

B - Action de divers facteurs sur la fixation du cholestérol par l'intestin.

- effet des sels biliaires
- effet du contenu intestinal

C - Rôle du cholestérol entraîneur

Recherche d'un maximum de fixation éventuel en fonction des doses de cholestérol employé dans les essais.

D - Essai d'étude de l'antagonisme sitostérol-cholestérol au niveau de la fixation intestinale.

I - EXPOSE DES TECHNIQUES

Nous traiterons successivement des techniques physiologiques employées, puis des techniques chimiques.

A - TECHNIQUES PHYSIOLOGIQUES -

L'intestin peut se contracter et respirer durant un certain temps dans un milieu spécial. WILSON a contrôlé que les propriétés physiologiques n'étaient pas modifiées.

Pour travailler "in vitro", plusieurs conditions essentielles s'imposent.

- disposer d'une solution qui assure une survie aux tissus.
- être en mesure de contrôler cette survie.
- Préparer et traiter convenablement l'organe en expérience.

1) le milieu employé

Pour toutes nos recherches, nous utilisons des fioles de Warburg où nous travaillons en aérobiose. L'atmosphère est un mélange à (95 % d'oxygène

(
(5 % de CO_2

Les morceaux d'intestin sont mis en contact avec une émulsion préparée à l'aide d'un corps gras : huile ou acide oléique, contenant en dissolution les stérols et dispersé dans une solution de KREBS-RINGER bicarbonatée à 3 o/oo de glucose.

La composition de la solution de KREBS-RINGER (UMBREIT et COLL) (88) est la suivante :

20 cm ³ de CINa	à 4,5 %
0,8 cm ³ de ClK	à 5,75 %
0,6 cm ³ de Cl_2Ca	à 6,1 %
0,2 cm ³ de $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$	à 10,55 %
0,2 cm ³ de SO_4Mg	à 19,1 %

Ce mélange est dilué à 109 cm³ avec de l'eau bidistillée, puis on ajoute :

- 21 cm³ de CO₃HNa à 1,3 % dans lequel on a fait passer durant une heure un courant de CO₂ (Krebs bicarbonaté).

La solution additionnée encore de 3 o/oo de glucose, est gazéifiée pendant 10 minutes avec le mélange gazeux : O₂ = 95 %, CO₂ = 5 % - puis utilisée rapidement.

Nous verrons plus loin, selon les différentes expériences, comment sont préparées les émulsions.

Milieu et fragments d'intestins sont introduits dans des fioles de Warburg de 25 cm³. On fait passer pendant cinq minutes un fort courant gazeux O₂, CO₂. Puis, chaque fiole reliée à son manomètre est refermée et agitée dans un bain-marie à 37°, à raison de 90 oscillations par minute, d'amplitude égale à 4 cm (WILSON). (94).

2) Contrôle de survie

Il a été fait en mesurant la respiration des tissus.

D'après les dénivellations lues au manomètre, on peut calculer les quantités d'oxygène consommées par les tissus en fonction du temps. De ce fait, on voit si les tissus respirent normalement et si d'un bout à l'autre de l'expérience, cette respiration reste égale et ne faiblit pas.

Pour ce contrôle, nous remplaçons le Krebs bicarbonaté par une solution de Krebs-phosphaté dont la composition est la suivante :

- aux 109 cm³ de mélange de sels, on ajoute à la place de la solution de bicarbonate,

- 12 cm³ de PO₄Na₂K à 1,78 % et à pH 7,4.

La solution obtenue est additionnée de 3 o/oo de glucose et gazéifiée durant 10 minutes par de l'oxygène pur.

L'atmosphère des fioles est également de l'oxygène pur.

A la page suivante est réalisé un graphique (n° 6) où sont consignés les résultats de deux contrôles de respiration.

Les mesures effectuées nous ont permis de constater, qu'après trois heures, l'intestin respire normalement et que ce temps de contact peut être adopté dans nos expériences.

3) Préparation des morceaux d'intestin

Les animaux d'expérience sont des rats blancs pesant 150 à 250 grammes, fournis par le centre d'élevage de Commentry (Allier)

Habituellement nourris au ratigène (Alimentation Equilibrée) ils sont mis à jeun la veille des expériences.

On les sacrifie par décapitation et leurs intestins grêles sont prélevés aussitôt (du duodénum à la jonction iléocaecale).

La tunique est dégraissée, débarrassée de tout débris de mésentère.

On chasse le contenu intestinal et on lave soigneusement la muqueuse avec une solution saline : glucose 3 o/oo, ClNa 9 o/oo.

On ouvre l'intestin en suivant la ligne d'insertion du mésentère.

Le ruban ainsi obtenu est épongé avec du papier filtre et fragmenté.

- Pour éviter qu'une question de topographie influe sur les résultats, nous découpons à partir du duodénum des morceaux d'intestin d'environ 1 cm de long dont :

le 1er est destiné à la fiole 1
le 2ème est destiné à la fiole 2
etc.... jusqu'à la Nième fiole.

On recommence la même répartition successive jusqu'à ce que le poids total de tissus dans chaque essai soit d'environ 500 milligrammes.

Cela nécessite en général 3 à 4 fragments.

Intestins et milieux étant prêts, on met le tout en contact durant 3 heures.

Passé ce temps, il reste encore à accomplir une opération importante.

4) Le lavage des morceaux d'intestin

Il faut enlever soigneusement de la surface de l'intestin, toute trace du milieu extérieur radioactif.

Le tissu ne doit conserver que la seule radioactivité qu'il a physiologiquement fixée.

Les fioles de Warburg sont retirées du B.M. A l'aide d'une pince fine, on sort un à un les morceaux d'intestin et on les rince par jet de pissette avec la solution saline glucose-ClNa. Puis, on les transfère, pour une demi-heure, dans des bêchers contenant un assez grand volume de la solution saline.

On fait, de cette manière, deux lavages successifs de 30 minutes, entrecoupés chaque fois d'un rinçage à la pissette.

Puis on effectue un dernier lavage de 30 minutes, mais cette fois avec une solution alcoolique à 40 %.

Après un dernier rinçage à la pissette, les morceaux éponges sont transférés dans des petits erlens de 50 cm³.

La partie physiologique de l'expérience est terminée.

Il ne reste qu'à déterminer le taux de fixation du cholestérol sur la muqueuse intestinale.

Consommation d'O₂
en mm³

GRAPHIQUE n° 6

2 contrôles de respiration de fragments
d'intestin pendant 4 heures.



B - TECHNIQUES CHIMIQUES -

Nous utilisons les méthodes décrites au chapitre des techniques générales à savoir :

- extraction chloroformique des lipides après saponification des tissus,
- isolement du cholestérol par précipitation à la digitonine.
- Comptage au Windowless de la radioactivité du complexe digitonique.

La correction d'autoabsorption des digitonides est réalisée à l'aide de la courbe n° 5, après évaluation du cholestérol total de la cupule par colorimétrie. (Méthode de SPERRY et WEBB). (74).

II - LES EXPERIENCES

A - MISE AU POINT D'UNE FORMULE D'EMULSION -

Lorsque nous avons traité des techniques physiologiques mise en oeuvre dans notre recherche "in vitro", nous n'avons pas donné la composition de l'émulsion employée.

La raison est que celle-ci fait l'objet d'une étude assez longue dont nous croyons bon de parler d'une manière plus détaillée.

Le milieu de base assurant la survie des fragments d'intestin est la solution de Krebs-Ringer bicarbonatée. A cette solution il faut incorporer du cholestérol radioactif additionné de cholestérol ordinaire comme "entraîneur".

Le stérol n'étant pas soluble en milieu aqueux , nous pensons l'introduire sous forme d'une solution huileuse émulsionnée dans le milieu de KREBS.

COOK (19) a depuis longtemps mis en évidence l'action bénéfique des graisses sur l'absorption intestinale du cholestérol. Nombre d'auteurs se sont ralliés à cette opinion (FAVARGER, GERLACH et ROTH (29) - KIM et IVY (49) - LIN, KARVINEN et IVY (53).

KIM et IVY (49), SWELL , FLICK, FIELD et TREADWELL (79), LIN, KARVINEN et IVY (54) ont même précisé que dans la molécule de graisse neutre, les acides gras sont les vecteurs de cette action.

Le choix d'une dissolution du cholestérol dans l'huile est donc justifié.

Mais l'agitation que subissent les fioles de Warburg dans le bain-marie, est insuffisante pour obtenir une émulsion où le cholestérol soit finement dispersé au contact des tissus.

Il est nécessaire d'ajouter au système huile-eau, un agent

émulsionnant.

Les sels biliaires semblent tout indiqués pour remplir cet office. Ils ont, en outre, un rôle indispensable dans l'absorption intestinale du cholestérol comme l'ont démontré "in vivo" SIPERSTEIN, CHAIKOFF et REINHARDT (69).

a) Emulsions (Huile de coton + sels biliaires dans la solution de Krebs)
(Acide oléique + sels biliaires dans la solution de Krebs)

Dans une première expérience, nous mettons en parallèle l'action de deux émulsions dont l'une est préparée avec un corps gras complexe : l'huile de coton, l'autre avec un corps pur : l'acide oléique.

Nous procédons de la manière suivante:

dans 6 petits erlens, nous répartissons (tableau n° 7)

Tableau N° 7

N° des erlens	1	2	3	4	5	6
cholestérol ordinaire.	0mg	1mg	10mg	0	1 mg	10mg
Acide oléique contenant en dissolution du cholestérol- C^{14}	VI ^{stes}	VI	VI			
Huile de coton contenant en dissolution du cholestérol- C^{14}				VI	VI	VI
Cholestérol- C^{14} ainsi introduit	7000 ^{c/m}	7000	7000	7000	7000	7000
	dissolution par chauffage au bain-marie, puis nous ajoutons					
Sol.de Krebs bicarbonatée	5,7 ^{cm3}	5,7	5,7	5,7	5,7	5,7
Sol.aqueuse à 10% de sels biliaires du commerce	0,2 ^{cm3}	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2

Les erlens sont soigneusement agités pendant cinq minutes. Puis on prélève dans chacun d'eux 3 cm³ de l'émulsion obtenue que l'on transfère dans une fiole de Warburg.

A chacune de ces fioles sont alors ajoutés les tissus : 500 milligrammes environ, mais exactement pesés.

Après gazéification, nous mettons à incuber durant 3 heures au BM à 37°.

Passé ce temps, les tissus sont retirés, lavés. On saponifie et le cholestérol est extrait comme il a été décrit précédemment.

Les composants et les résultats trouvés sont résumés dans le tableau n° 8.

TABLEAU N° 8

Fioles n°	1	2	3	4	5	6
Cholestérol -4-C ¹⁴	3.500 ^{cm}	3.500	3.500	3.500	3.500	3.500
Cholestérol ordinaire en mg	0	0,5	5	0	0,5	5
<u>Acide oléique</u>	III ^{gtes}	III	III			
<u>Huile de coton</u>				III	III	III
Sol. de sels biliaires à 10 %	0,1 ^{cm3}	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Sol. de Krebs bicarbonatée et glucosée	3 ^{cm3}	3	3	3	3	3
Poids de tissus dans l'essai (en mg)	642mg	481	692	763	565	564
Radioactivité retrouvée au total après correction d'auto-absorption et ramenée à 500 mg de tissus	238cm	242	120	68	130	122
Pourcentage de cholestérol radioactif fixé sur la tunique intestinale	6,6 %	6,6 %	3,3 %	2 %	3,5 %	3,3 %

Nous constatons au cours de cette expérience que l'émulsion à base d'huile de coton est très instable et qu'il se reforme des gouttes graisseuses au sein de la solution de Krebs. Ceci explique, peut-être, le taux de fixation plus faible obtenu avec cette émulsion. Les muqueuses sont moins bien mises en contact avec le cholestérol qui reste dans les gros globules graisseux au lieu d'être finement dispersé dans toute la solution.

Nous abandonnons cette formule et nous réalisons une expérience complémentaire employant uniquement l'émulsion faite :

- d'acide oléique, sels biliaires dans une sol. de Krebs.

Dans le tableau n° 9, se trouvent consignés : la répartition des différents éléments dans les fioles de Warburg et les résultats obtenus.

Nous employons les intestins grêles de 2 rats : le premier animal fournira les essais 1, 2 et 3 ; le second animal, les essais 4, 5, 6.

A la suite de l'expérience, nous sommes amenée à penser que cette fois encore la formule d'émulsion n'est pas entièrement satisfaisante. Après les trois heures d'incubation, une trace blanche crémeuse est restée collée aux parois des fioles de Warburg dénotant une instabilité des composants.

En conclusion, de ces deux premiers essais, il nous faut reconnaître que l'addition de sels biliaires, comme seuls agents émulsionnants, est insuffisante à maintenir la dispersibilité et la stabilité parfaite du système.

Le problème ne semble pouvoir être résolu que par l'introduction dans nos émulsions d'un agent tensioactif plus puissant.

Selon COOK, "cholestérol" (19) un certain nombre de ces composés particulièrement les détergents non-ioniques comme les "Tweens" ou les "Tritons" facilitent l'absorption de substances telles que les huiles minérales.

TABLEAU N° 9

(R a t N° 1)

(R a t N° II)

Fioles n°	1	2	3	4	5	6
Cholestérol- C^{14} en c/min.	3, 500	3.500	3.500	3.500	3.500	3.500
Cholestérol entraîneur	0mg,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Acide oléique	0, ^{cm3} 075	0,075	0.075	0,075	0,075	0,075
Sol.aq. de sels biliaires à 10 %	0,075	0,075	0,075	0,075	0,075	0,075
Sol. de Krebs bicarb. et glucosée q.s.q.	3 cm3	3	3	3	3	3
Poids de tissus dans l'essai	452 mg	467	478	509	489	500
Radioactivité retrouvée au total après correction de self-absorption et ramenée à 500mg de tissus	84 c/m	106	92	218	106	51
Pourcentage de cholestérol radioactif fixé sur la tunique intestinale	2,3 %	3	2,5	6	3	1,7

WELLS (93) a montré récemment sur des rats que l'addition de Tween 80 à des régimes riches en cholestérol augmente l'absorption de ce dernier. Les teneurs en cholestérol du sang et du foie sont accrues.

Ceci nous décide à introduire le Tween 80 dans nos essais.

En opérant comme précédemment, nous réalisons deux expériences identiques mais où les émulsions sont faites :

- d'acide oléique et de sels biliaires dans la solution de Krebs.

b/ d'acide oléique, de Tween 80, et de sels biliaires dans la solution de Krebs.

Toutes les données et tous les résultats sont réunis dans le tableau n° 10.

TABLEAU N° 10

	I	2	3	4	5	6
	<u>Acide oléique</u>			<u>Ac. oléique + Tween 80</u>		
Cholestérol -4-C ¹⁴ en c/min.	3.500	3.500	3.500	3.500	3.500	3.500
Cholestérol entraîneur	0mg,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Acide oléique en cm ³	0,075	0,075	0,075	0,075	0,075	0,075
<u>Tween 80</u> en cm ³	-	-	-	0,15	0,15	0,15
Sol.aq.de sels biliaires (10 %) en cm ³	0,075	0,075	0,075	0,075	0,075	0,075
Krebs glucosé et bicarbonaté q.s.p.	3 cm ³	3	3	3	3	3
Poids de tissus employés dans l'essai	518mg	497	487	522	531	521
Radioactivité retrouvée après correction d'autoabsorption et ramenée à 500 mg de tissus	216 ^{cm}	326	232	128	132	113
Pourcentage de cholestérol radioactif fixé sur 500 mg de tunique intestinale.	6%	9	6,4	3,5	3,6	3,1

Cette fois encore, nous constatons que l'émulsion avec acide oléique et sels biliaires seuls, a laissé un dépôt crémeux sur les parois des fioles de Warburg.

Par contre, l'émulsion où a été introduit du Tween 80 est restée parfaitement stable après 3 heures passées au BM à 37°. Les parois des fioles correspondantes sont nettes de tout dépôt.

- La lecture des manomètres de contrôle (exemple : courbe B du graphique n° 6 des essais de respiration, au chapitre des techniques physiologiques) nous montre que le Tween 80 n'a en rien altéré les propriétés vitales de l'intestin qui a respiré normalement durant les trois heures.

- Le pourcentage de fixation du cholestérol par l'intestin est un peu moins élevé en présence de Tween 80.

Des auteurs, SMITH, HAUKE et TREADWELL (73) ont publié récemment un travail sur la fixation du cholestérol par l'intestin "in vitro". Nous relevons, parmi leurs conclusions, celle d'un effet inhibiteur du Tween sur l'absorption intestinale du stérol.

Nous ne ferons pas nôtre, cette opinion. Nous admettons, à la suite de notre expérience, qu'un changement de tension superficielle produite par le Tween, qui est un agent mouillant, a empêché un dépôt mécanique du cholestérol sur la muqueuse comme sur les parois de la fiole. Son influence s'est certainement encore manifestée ensuite en assurant un lavage plus complet des villosités intestinales. Cette formule d'émulsion nous donnant satisfaction, nous la retenons pour les expériences suivantes.

B - ACTION DE DIVERS FACTEURS SUR LA FIXATION DU CHOLESTEROL PAR L'INTESTIN -

Afin de réunir des conditions optima pour nos essais ultérieurs, nous consacrons dans ce chapitre, une attention particulière au rôle joué par les sels biliaires et par le contenu intestinal dans la fixation du cholestérol.

1 - ROLE DES SELS BILIAIRES

Des auteurs, SIPERSTEIN, CHAIKOFF et REINHARDT (69) pensent que les sels biliaires sont indispensables à l'absorption intestinale du cholestérol.

Chez des rats, privés de bile par une fistule, ils n'observent aucun passage de cholestérol- $4C^{14}$ dans le canal thoracique après ingestion de ce composé.

Nous reproduisons ici le tableau publié par D.KRITCHEVSKY dans son livre "Cholestérol" (51).

Pourcentage de C_{14} retrouvé dans la lymphe du canal thoracique (d'après SIPERSTEIN, CHAIKOFF, REINHARDT)		
Heures	circulation biliaire intacte	Canule s/le conduit biliaire
4	8	0
8	26	0
16	42	0
28	47	0

Au contraire, pour FRIEDMAN, BYERS et SHIBATA (33), des petites quantités de cholestérol peuvent être absorbées, en l'absence de bile, si la dispersion est effectuée par quelque'autre agent.

Nombre de chercheurs sans être aussi catégoriques que les précédents, admettent l'effet bénéfique des sels biliaires sur l'absorption du cholestérol. Ils essayent, par leurs travaux, d'en éclairer le mécanisme d'action et d'en mesurer l'importance.

KIM et IVY, en 1952 (49), observent un effet favorable de l'acide cholique sur l'augmentation du cholestérol dans le sérum de Rat, en présence d'acide cléique.

SWELL, FIELD et TREADWELL (76) étudient "in vitro" l'activité de différents sels biliaires sur la cholestérol estérase du Rat. Ils notent des variations d'action selon la structure des sels biliaires et concluent à une spécificité de la cholestérol estérase en relation avec la structure de la molécule de sels biliaires.

Dans une expérience, faite ensuite, "in vivo", SWELL, FLICK, FIELD et TREADWELL (77) confirment les résultats obtenus "in vitro".

Différents sels biliaires sont administrés à des rats en plus de régimes riches en cholestérol et en graisses. Le cholestérol du sang augmente de manière très marquée après l'ingestion de cholate et de taurocholate, moins avec le desoxycholate et pas du tout avec le déhydrocholate.

Le nombre d'hydroxyles jouerait un rôle dans l'activité de la molécule.

De ces deux expériences "in vitro" et "in vivo" les auteurs concluent que les sels biliaires sont nécessaires à l'absorption du cholestérol à cause de leur fonction de "cofacteurs" pour l'activité de la cholestérol estérase.

En 1955, SWELL, FLICK, FIELD et TREADWELL (79) font paraître à nouveau un travail où ils énoncent qu'une quantité suffisante de sels biliaires doit être présente pour que l'absorption du cholestérol ait lieu, le flux biliaire étant nécessaire à l'activité de la cholestérol estérase.

Cette opinion est contredite, peu après, par FRIEDMAN (35). Les sels biliaires aideraient à l'absorption du cholestérol autrement qu'en agissant sur l'estérification.

En introduisant directement dans le duodenum de rats, du cholestérol sous le même état physique et chimique qu'il est trouvé dans la lymphe thoracique, c'est-à-dire estérifié, FRIEDMAN n'obtient pas d'absorption significative du stérol en l'absence de bile.

Plus tard, avec des rats ayant des fistules sur le canal thoracique, SWELL et coll.(83) vérifient à nouveau la spécificité de certains sels biliaires dans l'absorption du cholestérol.

Les auteurs pensent alors qu'un complexe du cholestérol avec les sels biliaires se forme dans la lumière intestinale et pénètre la muqueuse.

Beaucoup d'auteurs ont considéré l'action des sels biliaires ou de la bile dans son ensemble, sans essayer de mettre en évidence une spécificité d'action.

Monsieur le Professeur WOLFF (95) trouve qu'un mélange de sels biliaires du commerce stimule la résorption intestinale du cholestérol. En étudiant la cholestérolémie du lapin, il voit que l'addition de ce mélange rend perceptible l'absorption de doses faibles de cholestérol.

VAHOUNY, WOO et TREADWELL (89) montrent qu'une circulation biliaire intacte et continue est plus efficace que n'importe quel sel ajouté seul au régime pour promouvoir l'absorption du cholestérol.

DEUEL (24) pense que l'absorption intestinale du cholestérol est rendue possible par l'action hydrotopique des sels biliaires.

Pour COOK (19), la fonction de la bile est de disperser le cholestérol sous une forme moléculaire propice à une bonne absorption.

C'est l'opinion qui prévaut actuellement.

Après la lecture de tous les travaux cités, nous pensons que les sels biliaires facilitent grandement l'absorption intestinale du cholestérol même s'ils ne sont pas absolument indispensables.

Nous voulons voir, dans les conditions expérimentales qui sont nôtres, si leur suppression pure et simple est capable de perturber la fixation du cholestérol par l'intestin grêle.

Nous avons vérifié précédemment que le Tween 80 ajouté à l'émulsion lui assure une parfaite stabilité. La présence de sels biliaires, en tant qu'agents émulsifiants est, de ce fait, devenue superflue.

Nous pouvons les soustraire sans entraver la bonne marche technique d'une expérience de fixation du cholestérol.

Nous opérons avec deux rats :

- un dont l'intestin est mis en contact durant les 3 heures avec une émulsion contenant :

(cholestérol
(acide oléique
(sels biliaires
(Tween 80

- l'autre dont l'intestin est mis en contact durant le même temps avec une émulsion identique à la précédente mais dont les sels biliaires sont exclus.

Les éléments de l'expérience et les résultats sont réunis dans le tableau n° 11.

La fixation du cholestérol par l'intestin grêle est pratiquement nulle dans les essais ne contenant pas de sels biliaires alors qu'elle est normale dans l'autre partie de l'expérience.

En conclusion, les sels biliaires semblent indispensables pour assurer une bonne fixation intestinale du cholestérol.

En leur absence, un pourcentage presque nul de cholestérol est fixé.

- TABLEAU N° 11 -

Fioles n°	I	2	3	4	5	6
Cholestérol -4-C ¹⁴	1050 ^{cm}	1050	1050	1050	1050	1050
Cholestérol entrâi- neur en mg	0	1,5	5	0	1,5	5
Acide oléique	0,1 ^{cm3}	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Tween 80	0,2 ^{cm3}	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
<u>Sol.aq.sels</u> <u>biliaires à 10%</u>	0,1 ^{cm3}	0,1	0,1	-	-	-
Krebs glucosé et bicarbonaté	4 ^{cm3}	4	4	4	4	4
Poids de tissus employés dans l'essai	459mg	491	472	505	426	498
Radioactivité retrouvée après correction (- d'autoabsorption (- ramenée à 500mg (de tissus	38 ^{cm}	44	15	0	3	9
Pourcentage de cho- lestérol radioactif fixé sur 500 mg de tunique intesti- nale	3,5%	4,2	1,5	0	0,3	0,9

2 - RÔLE DU CONTENU INTESTINAL

De la même manière que nous venons d'étudier l'action des sels biliaires, nous voulons voir si le liquide normalement contenu dans l'intestin a un rôle sur la fixation du cholestérol.

Il peut s'y trouver des éléments favorisant cette fonction biologique; nous pensons tout particulièrement à la cholestérol-estérase pancréatique, déversée dans l'intestin et dont le rôle a été et est encore sujet à controverse.

Selon HERNANDEZ, CHAIKOFF et KIYASU (46) il se produit une plus forte absorption du cholestérol C_{14} en présence de bile et de suc pancréatique que sans suc pancréatique.

Etudiant l'activité enzymatique de la cholestérol-estérase sur des broyats de muqueuses intestinales de rats, SWELL, BYRON et TREADWELL (75) trouvent, à la fois, un effet hydrolysant et estérifiant aux extraits obtenus.

Par contre, lorsqu'ils utilisent des rats pancréatectomisés à 95 %, 28 jours avant l'expérience, ils voient que l'activité enzymatique de la muqueuse est considérablement affaiblie.

Ils en concluent que le pancréas est la source majeure de l'enzyme trouvé dans la muqueuse intestinale et qu'il a un rôle essentiel.

BYERS et FRIEDMAN (13) ne sont pas de cet avis. Dans leurs expériences sur le Rat, l'exclusion du flux pancréatique a peu d'effet sur l'absorption du cholestérol et des lipides. Même après une pancréatectomie et bien que les animaux soient dans un très mauvais état général, il y a encore un appréciable pourcentage d'absorption.

Les auteurs pensent que 28 jours après la pancréatectomie, il y a peu de chance qu'il demeure encore dans le jus intestinal une quantité suffisante d'enzymes provenant du pancréas.

Selon eux, la dispersion du pancréas du Rat à travers le mésentère est un phénomène anatomique qui plaide en faveur d'une présence possible d'acini pancréatiques dans la paroi intestinale elle-même. Cet éparpillement se voit d'ailleurs dans d'autres espèces telles le Chien.

Il en résulte que la muqueuse intestinale peut très bien se suffire à elle-même. De toute manière, l'addition d'extract pancréatique au régime de rats normaux de contrôle, n'augmente pas leurs possibilités d'absorption du cholestérol.

Pour FRIEDMAN et BYERS, l'extract pancréatique ne serait donc aucunement indispensable.

C'est également l'avis de LIN, KARVINEN et IVY (55) à la suite de leurs expériences. Chez des rats recevant un régime sans graisse, additionné quotidiennement de 50 mg de cholestérol, 40% de ce stérol sont absorbés indifféremment, que le flux pancréatique soit exclu ou non.

D'autres auteurs, FAVARGER(30), COOK (19) partagent l'opinion que l'apport du pancréas n'est pas nécessaire à une bonne absorption intestinale du cholestérol.

Pour étudier l'action du contenu intestinal, nous réalisons une expérience semblable aux précédentes. Une seule différence :

dans deux fioles de Warburg, l'intestin n'est pas débarrassé de son contenu, ni lavé tandis que dans les deux autres fioles, il est nettoyé, comme d'habitude avec la solution saline (glucose-CINa).

De cette manière, en confrontant les taux de cholestérol fixés dans chacun des 4 essais, il sera possible de discerner si le contenu intestinal a ou non une action.

Les résultats sont réunis dans les tableaux n° 12 et 13 :

Après ces deux expériences, il nous semble possible de conclure que le contenu intestinal, dans sa totalité, n'influe pas sur la fixation du cholestérol-4-C¹⁴, au moins dans les conditions opératoires que nous employons.

- TABLEAU N° 12 -

Fioles N°	1	2	3	4
Cholestérol- 14 C	5.000cm	10.000	5.000	10.000
Cholestérol entraîneur en mg	1,5	1,5	1,5	1,5
Acide oléique	0,1cm ³	0,1	0,1	0,1
Tween 80	0,2cm ³	0,2	0,2	0,2
Sol.aqueuse de sels biliaires (10%)	0,1cm ³	0,1	0,1	0,1
Krebs glucosé et bicarbonaté	4 cm ³	4	4	4
	<u>contenu intestinal</u>		<u>pas de contenu intest.</u>	
Poids de tissus employés dans l'essai	460mg	490	394	482
Radioactivité retrouvée après correction (d'autoabsorp- tion (ramenée à (500mg de (tissus	80c/m	87	98	92
Pourcentage de cholestérol radioactif fixé	1,6%	0,8%	2%	0,9%

Une seconde expérience identique a donné ces résultats :

- TABLEAU N° 12 -

Fioles n°	1	2	3	4
Cholestérol-4=C ¹⁴	5.000c/m	10.000	5.000	10.000
Cholestérol entraîneur	1mg,5	1,5	1,5	1,5
Acide oléique	0cm3,1	0,1	0,1	0,1
Tween 80	0cm3,2	0,2	0,2	0,2
Sol. aqueuse de sels biliaires (10%)	0cm3,1	0,1	0,1	0,1
	<u>Contenu intestinal</u>		<u>Pas de contenu intestinal</u>	
Krebs glucosé et bicarbonaté	4 cm3	4	4	4
Poids de tissus employés dans l'essai	457mg	457	479mg	509
Radioactivité retrou- vée après (d'autoab- correction (sorption (ramenée à (500 mg de (tissus	88c/m	107	82	212
Pourcentage de cholestérol radioactif fixé sur 500 mg de tissus	1,7%	1	1,6	2,1

Si le mucus intestinal contient une assez forte proportion de cholestérolestérase, provenant du pancréas, celle-ci n'a pas d'activité marquée.

Sur ce point, nos résultats seraient en désaccord avec ceux de SMITH, HAUKE et TREADWELL (73) publiés postérieurement à ce travail. Ces auteurs trouvent une inhibition de la fixation du cholestérol par l'intestin en présence d'extrait pancréatique.

En conclusion :

Le contenu intestinal n'influant pas sur la fixation du Cholestérol- 4-C^{14} dans les conditions utilisées pour nos expériences, il sera inutile de nous embarrasser de ce facteur supplémentaire.

Nous reprendrons la technique de lavage des intestins avec la solution saline avant chaque expérience.

C - RÔLE DU CHOLESTÉROL ENTRAÎNEUR

Les doses de cholestérol- $4-C^{14}$ que nous employons dans nos expériences sont pratiquement nulles pondéralement.

Il semble évident que la présence de cholestérol ordinaire, utilisé simultanément avec le corps radioactif, facilitera l'absorption de celui-ci, en matérialisant l'élément à fixer sur la membrane intestinale.

Il est très possible aussi qu'un maximum d'absorption ait lieu en fonction des doses de cholestérol ordinaire employé comme "entraîneur".

Mais il est bon que l'élément radioactif ne soit pas "noyé", dilué à l'extrême par cet entraîneur.

L'absorption, d'autre part, semble n'avoir lieu proportionnellement à la dose administrée que si celle-ci demeure dans des limites physiologiques. Une trop forte surcharge en cholestérol doit diminuer le pourcentage de fixation du fait d'une limite des possibilités d'absorption de l'intestin.

Le fait est d'ailleurs démontré "in vivo".

LIN, KARVINEN et IVY (52) trouvent que des rats de 250 grammes ne peuvent pas absorber plus de 92 milligrammes de cholestérol par jour même si on leur en administre 200 ou 300 milligrammes.

A partir d'une ration journalière de 200 milligrammes, les quantités résorbées atteignent un seuil. Par contre-coup, le pourcentage de cholestérol absorbé diminue au fur et à mesure que les doses ingérées augmentent.

D'autres auteurs, ROTH et FAVERGER (66) puis ENGELHORN et FAVERGER (27) ont fait des expériences identiques.

Selon eux, le seuil n'est atteint que pour une masse de plus de 200 milligrammes de cholestérol par jour au lieu de 90. Mais eux aussi observent une diminution du coefficient de digestibilité quand la surcharge en cholestérol augmente.

Les chiffres publiés par ces derniers auteurs sont certainement plus proches de la réalité car ils opèrent avec des éléments marqués, alors que LIN et collaborateurs pratiquent des bilans fécaux uniquement par colorimétrie.

On trouve encore dans la littérature, d'autres exemples de cette limite de capacité de l'intestin.

FRIEDMAN, BYERS et SHIBATA (33) en mesurant les stérols de la lymphe et les stérols fécaux voient que 47 % sont absorbés lorsque la dose ingérée est de 50 mg et que l'absorption tombe à 34 % quand la dose de stérol est doublée.

VAHOUNY, WOO et TREADWELL (89) en analysant le contenu de la lymphe du canal thoracique, ne notent pas d'augmentation, absolue ou en pourcentage de l'absorption du cholestérol, au-delà de certaines quantités ingérées par l'animal.

Nous voulons étudier, nous aussi, l'influence des surcharges en cholestérol "in vitro". Du même coup, nous voulons voir quelle quantité de cholestérol entraîneur assure le meilleur taux de fixation du stérol, dans les conditions opératoires qui sont nôtres.

Pour ce faire, nous réalisons, successivement, deux expériences identiques où

- les doses de cholestérol- $4-C^{14}$ sont constantes.
- les doses de cholestérol entraîneur, au contraire, croissantes :

0 mg
0,25
0,5
1,5
3
5

Doses et taux de fixation obtenus sont notés dans les tableaux n° 14 et 15.

Après ces expériences, il nous paraît difficile de tirer des conclusions nettes quant à l'importance de la dose d'entraîneur.

Il semble que nous sommes restée dans les limites physiologiques normales.

Pour un des intestins employés, il y a un maximum de fixation du cholestérol $4\cdot C^{14}$ pour une dose d'entraîneur de 5 mg, alors que pour l'autre intestin, ce maximum a lieu à la dose de 1,5 mg.

Par ailleurs, nous constatons que chez chaque animal : les deux essais sans entraîneur faits dans les mêmes conditions donnent des résultats assez superposables.

- TABLEAU N° 14 -

Fioles n°	1	2	3	4	5	6	7
Cholestérol -4-C ¹⁴ en c/min.	3.360	3.360	3.360	3.360	3.360	3.360	3.360
<u>Cholestérol entraîneur</u>	<u>0 mg</u>	<u>0,25</u>	<u>0,50</u>	<u>1,50</u>	<u>3</u>	<u>5</u>	<u>0</u>
Acide oléique	cm ³ 0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Tween 80	cm ³ 0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Sol.aqueuse sels biliaires à 10 %	cm ³ 0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Krebs glucosé et bicarbonaté	4 cm ³	4	4	4	4	4	4
Poids de tissu employé dans l'essai	497 mg	500	499	498	491	493	491
Radioactivité retrouvée après correction (-d'autoabsorption -ramenée à 500 mg de tissus	35 mg	42	54	73	37	39	50
Pourcentage de cholestérol radioactif fixé sur 500 mg de tissus :	1 %	1,25	1,6	2,2	1,1	1,1	1,5

TABLEAU N° 15

Fliales n°	1	2	3	4	5	6	7
Cholestérol 4 - C ¹⁴ en c/min.	3.360	3.360	3.360	3.360	3.360	3.360	3.360
<u>Cholestérol entraînéur</u>	1 mg	0,25	0,5	1,5	3	5	0
Acide oleique	0 cm ³ , 1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Tween 80	0 cm ³ , 2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Sol.aqueuse de sels biliaires à 10 %	0 cm ³ , 1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Krebs glucosé et bicarbonaté	4 cm ³	4	4	4	4	4	4
Poids de tissus employé dans l'essai	499 mg	466	491	494	493	469	499
Radioactivité retrouvée après (d'autoabsorption correction (ramenée à 500 mg de tissus)	81 c/m	101	70	71	54	123	70
Pourcentage de cholestérol radioactif fixé sur 500 mg de tissus	2,4 %	3	2	2,1	1,6	3,6	2

D - ESSAI D'ETUDE DE L'ANTAGONISME SITOSTEROL - CHOLESTEROL AU NIVEAU DE LA FIXATION INTESTINALE -

Dans les travaux faits avant ce chapitre :

- Nous avons établi une formule d'émulsion stable permettant la fixation du cholestérol "in vitro".

- Nous avons été amenée à juger nécessaire la présence de sels biliaires pour cette fixation.

A partir de ces données, nous allons réaliser une expérience test. Reproduite dans les mêmes conditions, mais en présence de sitostérol, elle pourra nous permettre de juger de l'action antagoniste de ce produit sur la fixation du cholestérol par l'intestin.

- L'expérience-test -

Nous employons un rat de 145 grammes, nourri au ratigène, à jeun depuis la veille.

L'émulsion est préparée comme à l'habitude mais :

- avec une dose fixe et assez élevée de cholestérol-4-C¹⁴ = 10.000 coups/minutes.

- avec 4 doses croissantes de cholestérol entraîneur =

0 mg
1,5
5
10 mg

La répartition des morceaux d'intestin est celle décrite au début de nos techniques "in vitro".

Données et résultats sont consignés dans le tableau n° 16.

Les taux de fixation obtenus sont assez faibles principalement dans la seconde partie de l'expérience.

- Expérience avec β -sitostérol -

Elle est réalisée avec l'intestin d'un rat pesant 142 grammes.

L'animal, nourri au ratigène, est mis à jeun la veille de l'expérience.

L'émulsion employée, comporte les mêmes éléments que l'expérience-test, mis à part le cholestérol entraîneur qui en est exclu et remplacé par des doses croissantes de β -sitostérol soit:

0 mg
1,5
5
10 mg

Toutes les données numériques sont réunies dans le tableau n° 17.

En regardant les résultats de l'expérience avec β -sitostérol, nous constatons que tous les pourcentages de fixation du cholestérol sur l'intestin sont uniformément supérieurs à ceux notés dans les essais correspondants de l'expérience test.

D'autre part, les essais n° 1 et 5 ne contenant pas de sitostérol ne donnent pas un taux de fixation plus élevé que ceux ayant 1,5 - 5 et même 10 mg de β -sitostérol dans leur émulsion.

Comparée à l'expérience test, cette expérience ne nous permet donc pas de mettre en évidence un rôle antagoniste du sitostérol sur la fixation du cholestérol par la muqueuse intestinale.

Cela tient peut-être à la technique employée et nous amène à émettre deux hypothèses.

- L'effet antagoniste du sitostérol pourrait être de beaucoup inférieur à celui décrit, par exemple par HERNANDEZ, PETERSON et collaborateurs (43). La toute petite différence de fixation, à un moment donné, en présence de sitostérol ou sans sitostérol, passerait inaperçue avec cette technique et pourrait être masquée

par les écarts individuels relevés chez chaque rat.

- L'autre possibilité pourrait être que l'effet antagoniste du sitostérol s'exerce non pas au niveau de l'étape lumière intestinale-membrane, mais au contraire, durant la phase menant les produits absorbés de la muqueuse à la lymphe.

La "fixation" serait alors inchangée et son étude ne pourrait pas permettre de déceler une quelconque inhibition de l'absorption du cholestérol.

Bien entendu, rien n'empêche que les deux possibilités coexistent.

De toute manière, avec cette seule technique, nous ne sommes pas en mesure de vérifier le bien-fondé des hypothèses émises.

En conclusion :

Nous devons renoncer à utiliser la méthode "in vitro" puisqu'elle ne nous permet pas de poursuivre notre but : étudier l'inhibition de l'absorption intestinale du cholestérol par le sitostérol et par d'autres dérivés stéroliques.

Fioles n°	1	2	3	4	5	6	7	8
Cholestérol - 4 C ¹⁴	10.000 c/m	10.000	10.000	10.000	10.000	10.000	10.000	10.000
Cholestérol entraîné	0 mg	1,5	5	10	0	1,5	5	10
Acide cléique	0 cm ³ , 1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Tween 80	0 cm ³ , 2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Sol. aqueuse de sels biliaires à 10 %	0 cm ³ , 1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Krebs glucosé bicarbonaté	4 cm ³	4	4	4	4	4	4	4
Poids de memb. intestinale employée dans l'essai	402 mg	443	469	453	455	460	472	439
Radioactivité retrouvée après { d'autoab- correction { scription { ramenée à { 500 mg de { tissus	113 c/m	116	122	84	63	48	57	68
Pourcentage de cholestérol radioactif fixé sur 500 mg de tissus	1,1 %	1,1	1,2	0,8	0,6	0,5	0,57	0,7

- TABLEAU N° 17 -

Fiales	1	2	3	4	5	6	7	8
Cholestérol- $4C^{14}$	10.000 c^{14}	10.000	10.000	10.000	10.000	10.000	10.000	10.000
Cholestérol entraîné	0 mg	0	0	0	0	0	0	0
β - Sitostérol	0 mg	1,5	5	10	0	1,5	5	10
Acide oléique	0cm ³ , 1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Tween 80	0cm ³ , 2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Solaq. de sels biliaires à 10 %	0cm, 1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Krebs glucosé et bicarbonaté	4cm ³	4	4	4	4	4	4	4
Poids de tissu employé dans l'essai	460mg	509	517	522	509	503	450	430
Radioactivité retrouvée après correction d'autoabsorption	194 c/m	165	247	301	274	172	124	264
Ramenée à 500 mg de tissus.								
Pourcentage de cholestérol radioactif fixé sur 500 mg de tissu.	2 %	1,65	2,5	3	2,75	1,7	1,2	2,6

IIIème PARTIE

- TECHNIQUE " IN VIVO " -

ETUDE DE DEPÔTS DE CHOLESTEROL-4-C¹⁴ DANS LES

FOIES DE SOURIS

Trois moyens peuvent être utilisés pour étudier au delà de la barrière intestinale, l'absorption du cholestérol et les facteurs pouvant l'influencer :

- mesurer la teneur en cholestérol du sang
- mesurer la teneur en cholestérol de la lymphe thoracique
- évaluer le dépôt de cholestérol dans le foie

- EVALUATION DE LA TENEUR EN CHOLESTEROL DU SANG -

Il est connu que l'Homme ne réagit pas à une grosse ingestion de cholestérol par une hypercholestérolémie post-prandiale importante. Chez les animaux, il en est de même, mis à part le Poulet et le Lapin.

Chez ces derniers, on observe après administration massive de cholestérol, une courbe d'hypercholestérolémie très marquée. Selon l'ampleur relative de cette courbe, on peut évaluer l'absorption intestinale du stérol et étudier l'importance de différents facteurs sur cette fonction physiologique.

C'est ainsi que Mr. le Professeur WOLFF a pu établir en collaboration avec Mr. BRIGNON, un test d'absorption du cholestérol en 24 heures, chez le Lapin, étudier l'action des sels biliaires et de l'acide oléïque puis l'effet inhibiteur des stérols de sojà sur cette absorption (95).

En étudiant les variations de la cholestérolémie, PETERSON chez le Poussin (64) et POLLAK chez le Lapin (65) avaient eux aussi montré, dans des expériences de longue durée, que l'ensemble des stérols extraits du sojà, inhibent par leur présence l'absorption intestinale du cholestérol.

Nous entreprendrions volontiers une étude similaire, mais nous ne pouvons utiliser d'aussi gros animaux. Nous avons déjà indiqué, au début de ce travail, les raisons qui nous en empêchent.

Des animaux de faible poids comme la Souris ou le Rat sont résistants à l'hypercholestérolémie alimentaire. Comme l'ont expliqué FRIEDMAN et BYERS (34) leur pouvoir d'absorption du cholestérol semble un peu plus faible que celui du Lapin ou du Poulet, et surtout leur système réticulo-endothélial est capable de retirer rapidement du plasma les chylomicrons transportant le cholestérol exogène.

En conséquence, ne pouvant employer ni l'une, ni l'autre catégorie d'animaux, il est inutile de songer à l'usage d'une telle technique.

- EVALUATION DE LA TENEUR EN CHOLESTEROL DE LA LYMPHE DU CANAL THORACIQUE -

Selon BIGGS et collab. (7), la quasi totalité du cholestérol résorbé par la muqueuse intestinale est ensuite véhiculé par la lymphe du canal thoracique.

Stopper le cholestérol en cet endroit, au fur et à mesure qu'il afflue, puis le doser est une façon très sûre de chiffrer l'absorption.

Une technique opératoire, basée sur ce principe a été décrite par BLOOM et ses collaborateurs (9) et employée par HERNANDEZ (43) et par ROSENMAN (68).

Cette méthode parfaite sur le plan théorique, n'en présente pas moins de sérieux handicaps sur le plan technique. Elle nécessite une intervention chirurgicale, expose les animaux à des chocs opératoires puis à une survie dans un état non physiologique.

La digestion, qu'on voudrait normale, surtout dans l'ordre quantitatif est certainement perturbée.

A cause de tout cela, nous renonçons à employer semblable méthode d'investigation.

- EVALUATION DU CHOLESTEROL DEPOSE DANS LE FOIE -

Nous pensons que la détermination du dépôt de cholestérol dans le foie peut apporter des renseignements précieux sur l'absorption intestinale de ce produit.

A diverses reprises, on note dans la littérature l'emploi de cette méthode pour mettre à l'épreuve les "antagonistes".

ALFIN-SLATER, WELLS et collab.(1) étudient l'effet des stérols des plantes sur les constantes en cholestérol chez le Rat.

Les auteurs administrent aux animaux différents régimes dépourvus de cholestérol et de stérols de soja ou au contraire contenant l'un ou l'autre, ou les deux dans certaines proportions.

Après 6 semaines de ce traitement, ils ne notent pas de diminution dans les valeurs en cholestérol du plasma, sous l'influence des phytostérols. Par contre, le cholestérol total et les lipides totaux du foie sont de beaucoup inférieurs à ceux trouvés habituellement dans un régime contenant le cholestérol comme seul stérol supplémentaire.

On peut même voir que les valeurs trouvées sont sensiblement celles des foies des animaux témoins, soumis simplement à un régime normal équilibré.

BURKE, Mc CANDLESS et KRITCHEVSKY (11) essayent aussi de voir l'action des stérols de soja sur le dépôt dans le foie de cholestérol C^{14} après une ingestion unique du produit marqué.

Ils utilisent trois groupes de rats soumis auparavant durant 120 jours, à un régime surchargé de 3% de cholestérol ordinaire. Ils mesurent la radioactivité retrouvée dans la fraction insaponifiable du foie.

Dans le premier groupe, ayant reçu 3% de cholestérol pendant 120 jours, puis une ingestion unique de cholestérol C^{14} , ils trouvent en moyenne 6,61 % de produit marqué dans le foie.

Pour le second groupe, le régime a été aussi additionné de 3% de cholestérol pendant 120 jours, mais l'ingestion finale se compose du produit marqué, immédiatement suivi de 1 gramme de stérols de soja. Dans ce groupe, la moyenne de radioactivité retrouvée dans les foies est seulement de 1,80 % montrant l'effet inhibiteur des stérols des plantes.

Le dernier groupe est soumis à un régime composé de 3% de cholestérol, mais additionné cette fois, durant les 120 jours de 5% de stérols de soja. L'ingestion finale est uniquement composée du cholestérol radioactif.

L'effet des stérols a eu le temps de s'exercer d'une manière beaucoup plus efficace puisque les auteurs ne retrouvent dans le foie que 0,47 % de la radioactivité qu'ils ont administrée.

En 1955, BEHER et ANTHONY (5) étudient aussi la prévention du dépôt de cholestérol dans le foie par le β -sitostérol, mais ils utilisent comme animaux d'expérience, les souris.

Celles-ci sont soumises à des régimes de compositions variées pendant 3 semaines. Les auteurs les sacrifient après ce temps et déterminent le cholestérol total de leurs foies.

Leurs conclusions sont que :

- Des additions d'acide cholique à un régime riche en cholestérol, augmentent significativement le cholestérol total du foie, mais l'addition de β -sitostérol à un régime contenant déjà acide cholique et cholestérol diminue par contre, le cholestérol total du foie.

L'accumulation du cholestérol dans le foie, après une surcharge alimentaire en ce produit, semble donc pouvoir être prévenue par l'ingestion concomitante de phytostérols.

Nous référant à ces expériences positives, nous retenons la détermination du dépôt de cholestérol dans le foie comme moyen d'investigation pour étudier l'absorption intestinale du cholestérol et l'effet d'inhibiteurs de cette fonction.

Dans cette seconde partie, nous traiterons successivement:

I - DES TECHNIQUES EMPLOYEES -

Nous envisagerons:

A - Le choix d'un animal d'expérience et le traitement à lui faire subir.

B - La mesure du cholestérol radioactif fixé dans le foie.

II - DES EXPERIENCES -

A - La détermination du taux moyen de cholestérol-4-C¹⁴ retrouvé dans les foies de souris, 24 heures après l'ingestion d'un repas-test.

B - L'influence de la dose de cholestérol employé.

C - L'action du sitostérol sur le dépôt du cholestérol-4-C¹⁴ dans le foie.

EXPOSE DES TECHNIQUES EMPLOYEES

A - Les animaux d'expérience et leur traitement -

Les souris conviennent parfaitement à ces expériences puisqu'étant de faible poids, elles nécessitent la mise en oeuvre de peu de produits.

Les souris, de race blanche, que nous employons, proviennent d'un élevage de Maizières-les-Toul.

Elles pèsent environ 20 grammes (28 gr au maximum) et sont nourries avec des tourteaux constituant une alimentation équilibrée.

24 heures avant la mise en route de l'expérience, nous isolons les souris. Pour cela, elles sont mises chacune dans un bêcher au fond duquel est placée une toile métallique constituant un plancher surélevé qui laisse passer urines et matières fécales.

Le local où se trouvent les animaux est maintenu, durant toute l'expérience à une température de 22° C.

On supprime l'alimentation normale, au moment de la séparation des animaux, pour instituer une diète hydrique.

Au bout de 24 heures, il est administré aux souris un repas test sous forme d'un cm³ d'une émulsion contenant du cholestérol-4 et d'autres composants variables que nous citerons à chaque expérience.

Ce repas-test est donné en une seule fois à un moment précis à l'aide d'un trocart recourbé (diamètre voisin d'1 mm) à embout olivaire et branché sur une seringue tel qu'il est décrit par DUMAS (26).

Cette ingestion se révèle délicate. Dans les premiers essais nous avons perdu un grand nombre d'animaux, la sonde au lieu de passer dans l'oesophage, s'engageait dans la trachée artère. L'arrivée

de l'émulsion dans les poumons provoquait une mort à peu près instantanée. Certaines souris mourraient un peu plus tard, une muqueuse ayant certainement été déchirée au moment du passage du trocart.

Après le repas-test, les souris sont replacées dans leurs béciers respectifs et soumises durant encore 24 heures à une diète hydrique.

24 heures exactement après l'ingestion du produit marqué, les animaux sont sacrifiés par décapitation et les foies prélevés.

B - Détermination du cholestérol-4-C¹⁴ déposé dans le foie.

Dès leur prélèvement les foies sont pesés, puis broyés dans un appareil de Potter-Elvehjem. L'émulsion obtenue est amenée avec de l'eau distillée à un volume de 25 cm³.

On prélève 5 cm³ de l'émulsion qu'on saponifie par de l'éthylate de sodium.

Il reste à extraire les lipides, puis à précipiter le cholestérol sous forme de digitonide.

La mesure de la radioactivité du précipité est faite comme il est décrit au début de ce travail, dans les techniques générales.

EXPERIENCES

A - DETERMINATION DU TAUX DE CHOLESTEROL-4-C¹⁴ RETROUVE DANS LE FOIE DE SOURIS 24 HEURES APRES L'INGESTION DU STEROL -

Il nous semble normal de déterminer avant toutes choses, le pourcentage moyen de cholestérol-4-C¹⁴ qui vient se fixer sur le foie, lorsqu'on emploie des conditions opératoires standard.

Pour cette expérience préliminaire, nous employons 6 souris.

Nous basant sur les essais faits dans la partie "in vitro", nous préparons une émulsion comportant :

(cholestérol-4-C¹⁴ = 30.000 c/min.
(cholestérol entraîneur = 4 mg
(acide oléique = 0,1 cm³
(Tween 80 = 0,02 cm³
(Lait q.s.p. 1 cm³

Nous ne jugeons pas nécessaire d'ajouter des sels biliaires. Opérant "in vivo" sur des animaux normaux, nous pensons que les sels biliaires normalement présents dans le contenu intestinal suffisent à permettre la résorption de cette dose de cholestérol.

L'émulsion est administrée à chaque souris, selon le processus décrit au chapitre des techniques.

24 heures plus tard, nous sacrifions les animaux par décapitation et nous recueillons leurs foies, pourvus des vésicules biliaires.

Les foies sont pesés et traités comme nous l'avons expliqué.

Nous réunissons dans le tableau n° 18, la quantité de radioactivité retrouvée dans chaque foie et le pourcentage de fixation du cholestérol-4-C¹⁴ dans cet organe.

Les valeurs obtenues sont homogènes et la moyenne des taux fixés dans les foies est très proche de celle trouvée chez le Rat par BURKE, Mc CANDLESS et KRITCHEVSKY (11). Les auteurs indiquent un chiffre de 6,61 % après 120 jours d'un régime à 3% de cholestérol ordinaire.

TABLEAU n° 18

N° de la souris	Poids de l'animal en g	Poids du foie en mg	Radioactivité retrouvée au total dans le foie exprimée en c/min.	Pourcentage de radioactivité retrouvée dans le foie
1	23	1025	1950	6,5
2	21,5	922	1934	6,45
3	23	1141	2941	9,8
4	28	1275	2924	9,7
5	23	1046	2282	7,6
6	20,5	895	2099	7
				----- moyenne = 7,8 %

B - INFLUENCE DE LA DOSE DE CHOLESTEROL EMPLOYEE-

Dans les émulsions, le cholestérol radioactif représente pondéralement une quantité infime presque négligeable.

C'est pourquoi au cours de la première expérience, nous avons cru bon d'administrer, en même temps que le produit marqué, 4 milligrammes de cholestérol ordinaire par animal.

Nous voulons voir maintenant si ce cholestérol entraîneur joue un rôle important "in vivo" dans l'absorption du produit marqué et dans sa fixation sur le foie.

D'autre part, pour éviter une cause d'erreur due à la présence constante de cholestérol à des doses variables dans le lait, nous supprimons ce facteur d'incertitude.

Dans l'émulsion, nous remplaçons le lait par de l'eau.

Pour ne pas introduire d'un seul coup deux variantes, nous traitons :

- 5 souris avec une émulsion à base d'eau, ne contenant pas de cholestérol entraîneur.

- 2 souris-témoins avec une émulsion à base d'eau, mais contenant du cholestérol entraîneur à même dose (4 milligrammes) que dans l'expérience précédente.

Les valeurs trouvées sont réunies dans le tableau n° I9.

Si nous comparons les valeurs trouvées dans cette expérience à celles de l'expérience précédente, il ressort que le cholestérol entraîneur assure une stabilité dans les pourcentages de cholestérol-4-C¹⁴ fixés par le foie.

Pour les 5 souris n'ayant reçu que le produit marqué en émulsion, les taux de fixation sont beaucoup plus irréguliers et inférieurs à ceux des témoins ayant en plus de l'entraîneur.

- TABLEAU N° 19 -

N° de la souris	Poids de l'animal en g.	Poids du foie en mg.	Radioactivité trouvée au total dans le foie exprimée en c/min.	Pourcentage de radioactivité retrouvée dans le foie
<u>5 souris recevant une émulsion à base d'eau contenant seulement</u>				
	<u>du cholestérol $4-C^{14}$</u>			
1	16,5	938	2.205	7,3
2	17	828	919	3
3	18,5	941	1.462	4,7
4	22	991	1.790	6
5	18,5	990	2.770	<u>9,2</u>
				$\bar{M} = 6,04$
<u>2 souris-témoins recevant une émulsion à base d'eau contenant :</u>				
			(cholestérol $4 C^{14}$ (cholestérol ordinaire = 4 mg.	
6	19	1.124	2.897	9,65
7	16	818	2.893	<u>9,65</u>
				$\bar{M} = 9,65$

Pour les 5 souris n'ayant reçu que le produit marqué en émulsion, les taux de fixation sont beaucoup plus irréguliers et inférieurs à ceux des témoins ayant en plus de l'entraîneur.

Par contre l'emploi de l'eau comme base d'émulsion à la place du lait ne semble pas diminuer ou perturber la fixation du cholestérol-4-C¹⁴ dans le foie des animaux.

En conséquence, nous pouvons supprimer définitivement le lait des émulsions et le remplacer par de l'eau, mais il semble nécessaire de laisser dans les repas-test du cholestérol entraîneur.

Nous avons déjà rappelé dans la partie "in vitro" de notre travail que l'absorption intestinale du cholestérol chez le Rat semble être limitée en capacité et ne pouvoir aller au-delà d'un plafond (FAVARGER (66-27) LIN (52)). Il en est certainement de même pour la Souris, qui a un comportement biologique très voisin de celui du Rat.

Ceci nous amène à déterminer quelle dose d'entraîneur il est préférable d'utiliser dans nos expériences.

Il y a certainement une quantité optima qui donne suffisamment d'homogénéité aux résultats sans noyer le produit marqué de sa masse et sans diminuer par trop l'activité spécifique du cholestérol-4-C¹⁴.

Pour faire cette étude, nous traitons 32 souris de 16 à 22 grammes, divisées en 5 groupes.

Chaque groupe d'animaux reçoit un repas-test ainsi composé :

- (-cholestérol-4-C¹⁴ = 30.000 c/min.
- (-cholestérol entraîneur = doses variables,
 - (soit : 0mg - pour le 1er groupe
 - (: 2mg - pour le second groupe
 - (: 4mg - pour le 3^e groupe
 - (: 7mg - pour le 4^e groupe
 - (: 10mg - pour le 5^e groupe
 - (
- (-acide oléique = 0,1 cm³
- (-Tween 80 = 0,02 cm³
- (-Eau q.s.p. 1 cm³

24 heures après le repas-test, les animaux sont sacrifiés.

Nous prélevons les foies, sans les vésicules biliaires. Dans les épreuves précédentes nous avons constaté que souvent la vésicule risquait d'être rompue au moment du prélèvement du foie. Nous décidons de l'enlever systématiquement avant de prendre l'organe sur l'animal et d'en faire l'émulsion au Potter.

Nous réunissons dans le tableau n° 20 les résultats obtenus dans cette expérience.

Comme nous l'avons déjà remarqué, l'absence de cholestérol entraîneur dans le repas-test (groupe I) provoque une irrégularité des taux de fixation dans le foie.

Les moyennes des pourcentages de radioactivité retrouvée dans l'organe diminuent d'une manière prévisible au fur et à mesure que les quantités de cholestérol entraîneur augmentent dans les repas-test.

Les moyennes passent de 6,14 % en présence de 2 mg de cholestérol entraîneur à 3,4 % en présence de 10 mg de cholestérol entraîneur.

Après ces constatations, nous concluons que la dose de 2 mg est la plus favorable à une fixation quantitative et régulière du produit marqué.

Influence de la dose de cholestérol entraîneur

- TABLEAU N° 20 -

is	Poids de l'animal	Poids du foie	Radioactivité retrouvée au total dans le foie exprimée en c/min.	Pourcentage de radio-activité retrouvée dans le foie
<u>émulsion préparée sans cholestérol entraîneur</u>				
	16 g	894 mg.	1586 c/min.	5,3 %
	19,5	1068	2900	9,6
	17	1006	1194	4
	19	1031	1358	4,5
	18	993	2767	9,2
				$\bar{M} = 6,5\%$
<u>émulsion préparée avec 2 mg de cholestérol entraîneur</u>				
	20 gr	1152 mg	1942	6,5
	18	1230	1865	6,2
	15	913	1886	6,3
	20	928	2242	7,4
	17,5	864	1795	6
	17	931	1306	4,4
	21	1129	-	-
				$\bar{M} = 6,14\%$
<u>émulsion préparée avec 4 mg de cholestérol entraîneur</u>				
	16,5	999	1791	6
	18	1099	1112	3,3
	21	1129	1007	3
	20	1252	1287	4,3
	17,5	944	758	2,5
	17,5	1162	1500	5
	18,5	964	1206	4
				$\bar{M} = 4 \%$
<u>émulsion préparée avec 7 mg de cholestérol entraîneur</u>				
	20	1067	865	2,9
	21	1146	1064	3,5
	17	745	-	-
	21	1192	1620	5,4
	22	1294	1854	6,18
	21	1515	1810	6
				$\bar{M} = 4,08\%$
<u>émulsion préparée avec 10 mg de cholestérol entraîneur</u>				
	16	724	428	1,4
	17	741	762	2,5
	16	622	225	0,74
	17,5	1172	548	1,82
	18,5	1239	1805	6
	17,5	1027	1424	4,75
	20	1013	1981	6,6
				$\bar{M} = 3,4\%$

C - ACTION DU β -SITOSTEROL SUR LE DEPOT DU CHOLESTEROL-4-C¹⁴ DANS LE FOIE.

Possédant des valeurs de référence, nous voulons voir quelles seront les variations de la fixation du cholestérol-4-C¹⁴ dans le foie lorsqu'il sera ingéré par les animaux en même temps que du β -sitostérol.

Les doses de sitostérol sont choisies pour être 3,5 - 5 et 7 fois plus fortes que la dose de cholestérol entraîneur employée.

Nous réalisons cette expérience à l'aide de 21 souris, réparties en 3 groupes.

Chacune d'elles, reçoit le repas test suivant :

- (cholestérol-4-C¹⁴ = 30.000 c/min.
- (cholestérol entraîneur = 2 mg
- (β -sitostérol
 - (dans le groupe I = 2mg x 3,5 soit 7 mg
 - (dans le groupe II = 2mg x 5 soit 10 mg
 - (dans le groupe III = 2mg x 7 soit 14 mg
- (Acide oléique = 0,1 cm³
- (Tween 80 = 0,02 cm³
- (Eau qsp = 1 cm³

Le déroulement de l'expérience est le même que celui décrit précédemment.

Les résultats sont réunis dans le tableau n° 21.

Les moyennes des taux de fixation obtenus sont respectivement de :

1,07 % dans le groupe I
2,12 % dans le groupe II
1,21 % dans le groupe III

Comparées aux 6,14 % fixés précédemment, en présence de 2 mg de cholestérol entraîneur, mais sans antagoniste dans l'émulsion, il ressort que le sitostérol a un effet inhibiteur important sur le dépôt du cholestérol dans le foie de la Souris.

Cette inhibition est de l'ordre de 60 à 80 %.

- Ce n'est pas une inhibition totale puisqu'elle n'a pas aboli le dépôt du cholestérol -4-C¹⁴ dans le foie, même lorsque le sitostérol est sept fois plus abondant que l'entraîneur.

- Elle ne progresse pas en fonction des doses d'antagoniste employé; tout laisse supposer qu'aux concentrations où nous avons opéré, un effet limite a déjà été atteint.

Par voie de conséquence, on peut conclure que la résorption intestinale n'est pas, non plus, complètement bloquée sous l'influence du sitostérol.

Ainsi, bien que nous puissions constater une influence du β -sitostérol, nos résultats sont moins spectaculaires que ceux de HERNANDEZ, PETERSON et coll. (43)

Ceux-ci, nous le rappelons, ont noté chez des rats, animaux qui comme les souris résistent à l'hypercholestérolémie alimentaire une réduction de 90% du passage du cholestérol à travers la paroi intestinale sous l'influence du sitostérol employé avec du cholestérol dans le rapport 6/1.

Les conclusions que cette étude nous permet de formuler sont plus modérées.

Le β -sitostérol exerce une inhibition partielle sur le dépôt du cholestérol -4-C¹⁴ dans le foie de souris.

Partant de là, nous concluerons qu'il n'est pas un antagoniste absolu de la résorption intestinale du cholestérol.

Action du β - Sitosterol sur le dépôt du Cholestérol-4-C¹⁴ dans le foie

- TABLEAU n° 21 -

Poids de l'animal en g .	Poids du foie en mg .	Radioactivité retrouvée au total dans le foie exprimée en c/min.	Pourcentage de radioactivité retrouvée dans le foie
émulsion avec 2 mg de cholestérol entraîneur et (2 x 3,5) = 7 mg de β Sitostérol			
16	692	392	1,3
16	689	334	1,1
15	915	217	0,72
18	994	306	1
19	1226	438	1,45
17	732	305	1
22,5	1346	278	0,93
$\bar{M} = 1,07 \%$			
émulsion avec 2 mg de cholestérol entraîneur et (2 x 5) = 10 mg de β Sitostérol			
17	742	869	2,9
15	722	700	2,3
17,5	878	1227	4,1
19	1304	197	0,65
16	963	246	0,82
19	1002	818	2,7
15,5	1040	412	1,4
$\bar{M} = 2,12 \%$			
émulsion avec 2 mg de cholestérol entraîneur et (2 x 7) = 14 mg de β Sitostérol			
17	953	588	1,95
17	999	448	1,5
20,5	1040	250	0,85
18	939	415	1,4
19,5	1002	366	1,2
20	1185	171	0,6
19	1024	293	9,97
$\bar{M} = 1,21 \%$			

III ème PARTIE

ETABLISSEMENT DE BILANS FECAUX CHEZ DES RATS

RECEVANT DU CHOLESTEROL - $4-C^{14}$

Bien que du cholestérol se dépose dans le foie, rien n'exclut qu'une certaine quantité du stérol résorbé par la muqueuse intestinale n'y fasse qu'un bref passage ou s'accumule en d'autres endroits.

De plus, le cholestérol déposé dans le tissu hépatique, semble y subir rapidement des transformations.

Selon SIPERSTEIN et JAYKO (70), après une injection intraveineuse de cholestérol C^{14} , la fraction non saponifiable comprenant coprostérol, dihydrocholestérol et cholestérol ne représente pas plus de 25 % du total de C^{14} retrouvé dans la bile et les matières fécales.

Les auteurs précisent qu'approximativement 90 % du C^{14} du cholestérol marqué administré est recouvrable dans la bile. Mais du C^{14} de cette bile, 4 à 10 % seulement sont sous forme insaponifiable.

Nous craignons que nos précédentes expériences bien que donnant des résultats positifs ne soient qu'une image de l'action antagoniste du sitostérol : incomplète ou déformée par un métabolisme rapide du cholestérol absorbé.

Nous pensons qu'il est bon de faire une étude des bilans fécaux. C'est la seule technique qui déterminant le cholestérol non résorbé, prouve par différence une absorption plus ou moins forte du stérol.

Beaucoup de résultats ont déjà été obtenus en mesurant les stérols fécaux.

Mais dans l'emploi de cette technique, il faut prendre garde à plusieurs causes d'erreurs plus ou moins importantes :

La sécrétion biliaire et surtout intestinale de stérols est très abondante.

Si l'on veut étudier la pénétration de quantités physiologiques de cholestérol, il est indispensable d'utiliser un produit marqué. Par suite de dilution avec le cholestérol endogène, l'acti-

tivité spécifique du produit retrouvé dans les fèces est très diminuée. S'il s'agit du composé ordinaire, les différences dans le bilan fécal sont peu appréciables. Le cholestérol alimentaire est noyé par les stérols d'origine endogène.

On peut évidemment opérer avec une surcharge alimentaire importante, la proportion des stérols fécaux endogènes est alors moins grande et il devient possible, sans isotope, d'évaluer la quantité de cholestérol absorbé. Mais comme le fait remarquer FAVARGER : "l'administration d'un stérol à forte dose, modifie sans doute la sécrétion endogène".(31)

Une autre cause d'erreur est due au sort complexe du cholestérol et en particulier au fait qu'il est soumis au cycle entéro-hépatique.

Si une expérience de bilans dure plusieurs jours, le cholestérol résorbé par la muqueuse intestinale et introduit à l'intérieur de l'organisme peut être en partie excrété, sans changement chimique, par la bile. Revenu dans l'intestin, il subit à nouveau les phénomènes de la digestion au même titre que le cholestérol initialement ingéré.

Plus l'expérience se prolonge, plus les résultats diffèrent et tendent à changer la valeur des bilans.

Il est donc préférable que l'expérience dure seulement le temps nécessaire à un transit intestinal complet, après une seule administration de cholestérol marqué.

- Troisième possibilité d'erreur dans l'appréciation des bilans fécaux : le cholestérol en excès au moment de la digestion, n'est pas rejeté dans les fèces uniquement sous sa forme initiale. Il peut subir des transformations,

- sous l'influence d'un enzyme, il donne du cholestanol.

- par une hydrogénation exercée par des bactéries intestinales, une grande part du cholestérol non résorbé est transformé en coprostérol.

Cholestanol et coprostérol seraient en outre accompagnés de stérols variés dont la nature est mal définie.

D'après COLEMAN et WELLS (17) on trouverait dans la partie inférieure du tractus digestif du Rat, 6 β stérols différents.

Voici un tableau publié par les auteurs; on y voit la moyenne journalière des stérols excrétés chez des rats mâles adultes. Les animaux sont soumis à un régime "fat-free", aussi les stérols ont une source purement endogène. Ils proviennent soit d'une sécrétion dans l'intestin, soit surtout de la transformation du cholestérol endogène venant de la bile ou de l'intestin :

(cholestérol :	356	μ g
(		
(Δ 7-cholestenol :	538	μ g
(		
(7-déhydrocholesterol :	8,8	μ g
(		
(cholestanol :	164	μ g
(		
("Sterol D" :	358	μ g
(		
(Coprostanol :	3.210	μ g
(		
(ou Coprosterol		

Le "stérol D" serait surtout constitué de coprostérol. Le coprostérol est ici de beaucoup le plus important. On sait depuis longtemps qu'il est produit par action des bactéries sur le cholestérol.

Lorsque l'animal reçoit du cholestérol, mêlé à son régime, il peut donc excréter différents stérols en particulier du coprostanol venant de la transformation du cholestérol par des bactéries dans la lumière de l'intestin.

Il sera bon dans les expériences de bilans de posséder une technique qui mesure pratiquement l'ensemble des stérols intestinaux dérivant du cholestérol et non le cholestérol seul. Sinon nous aurions des résultats très au-dessous de la réalité.

Au contraire, le comptage de l'ensemble des stérols intestinaux radioactifs indiquera la quantité de cholestérol $-4-C^{14}$ non résorbé par la muqueuse intestinale.

En résumé, pour éviter les inconvénients que nous venons de citer, il faut administrer aux rats, en une seule fois du cholestérol. marqué, de forte activité spécifique.

L'évaluation du bilan fécal doit se faire durant un temps assez long pour permettre une absorption normale et complète, mais il ne doit pas se prolonger afin d'éviter au maximum les méfaits du cycle entérohépatique.

Ayant respecté ces conditions, il reste à extraire des matières fécales recueillies et à mesurer la radioactivité correspondant au cholestérol non absorbé par l'animal.

Un petit écueil marque encore cette technique finale :
la majeure partie du cholestérol absorbé est très vite éliminée sous forme de matériel saponifiable : de sels biliaires (BLOCH et coll.(8) - HAROLD et Coll.(42) - SIPERSTEIN et Coll.(70)- SIPERSTEIN et CHAIKOFF (72).

Quel que soit le mode d'administration du cholestérol- C^{14} , voie intraveineuse ou orale, la bile est son principal chemin d'excrétion: 90 % du C^{14} passe dans la bile et en majorité sous forme d'acides biliaires (90%).

Même si nous basons nos bilans sur la durée d'un transit intestinal, le cholestérol $-4-C^{14}$ résorbé dès le début de l'expérience va rapidement réapparaître dans la bile, puis dans l'intestin surtout sous forme de sels biliaires.

Heureusement, les bactéries intestinales ne semblent pas elles aussi procéder à une transformation de ce genre.

Après des mises en contact de cholestérol $-4-C^{14}$ avec des fèces de rats durant 72 heures à 37° , BALDIN retrouve encore, sous forme d'insaponifiable, 99 à 100 % de la radioactivité du stérol introduit.(2)

D'autre part, après les expériences de BYERS et BIGGS (12) nous savons qu'il ne se produit pas d'intraconversion de l'acide cholique en cholestérol dans l'organisme, ce qui aurait encore embrouillé le sort déjà bien complexe du cholestérol.

Une partie de la radioactivité retrouvée dans les matières fécales sera donc représentée par des acides biliaires dérivant du stérol résorbé.

Selon COLEMAN et WELLS (17), l'ensemble des stérols normalement retrouvés dans les fèces précipite sous forme de digitonide.

En faisant agir la digitonine sur un extrait contenant toute la radioactivité des fèces, il sera facile d'éliminer les composés biliaires qui ne précipitent pas en complexes.

Le comptage des digitonides permettra une mesure de la fraction radioactive représentant le "cholestérol -4-C¹⁴ non résorbé" par la muqueuse intestinale.

Comme il nous est accoutumé de faire, nous envisagerons successivement dans cette IIIème partie :

I - LES TECHNIQUES -

Nous traiterons :

A/ Des animaux utilisés

- leur régime
- l'administration du produit radioactif.
- la récolte des matières fécales.

puis nous verrons :

B/ Les méthodes spéciales nécessitées par ces expériences,

- le traitement des matières fécales en vue de l'extraction de la radioactivité
- l'évaluation de la "radioactivité totale" de l'extrait.
- l'évaluation des stérols fécaux représentant le cholestérol -4-C¹⁴ non absorbé.

II - LES EXPERIENCES -

Nous ferons successivement :

A/ Une étude cinétique de l'absorption intestinale du cholestérol, pour fixer la durée des expériences de bilans.

B/ Une évaluation de l'importance de l'absorption.

C/ Une mesure de l'effet antagoniste du β sitostérol par rapport aux valeurs trouvées précédemment.

EXPOSE DES TECHNIQUES

A - LES ANIMAUX UTILISES ET LEUR TRAITEMENT -

Toutes nos expériences sont faites sur des rats blancs adultes, pesant de 150 à 250 grammes. Ils nous sont envoyés par le centre d'élevage de Commentry (Allier).

1) Le régime

En temps normal, les animaux reçoivent du ratigène : aliment équilibré qui leur est donné sous forme de pâtée humide.

15 jours avant les expériences, le ratigène est remplacé par un régime synthétique équilibré.

Ce régime présente un double avantage :

- Il donne des fèces qui laissent ^{un} faible résidu à la dessiccation de l'extrait alcoolique obtenu ensuite au Kumagawa.
- Il permet de connaître très exactement la nature des éléments reçus en nourriture par les rats, donc il est toujours parfaitement reproductible.

Nous nous sommes inspirée du régime utilisé par CHAIKOFF (43) dans des études analogues aux nôtres :

Ce régime comprend :

(Farine de blé complète :	64,3%
(Caséine alimentaire (Coop. de Melun)	14,3%
(Lait en poudre, complet, non sucré	
((marque Mont Blanc)	6,8%
(Cl: Na	0,7%
(CO ₂ Ca	1,4%
(Végétaline	11 %
(Huile de foie de Morue	2 %
(IK	Traces

Il est rendu parfaitement homogène grâce à l'emploi d'un mélangeur du type Loedige.

Durant les expériences, les animaux reçoivent cette nourriture, à volonté, sous forme d'une pâtée.

2) Administration du Cholestérol radioactif

Après avoir été soumis, durant quinze jours, au régime synthétique, les rats reçoivent, sans jeûne préalable, un repas-test.

Ce repas comporte :

- 0,25 cm³ d'huile de coton pure ou 0,25 cm³ d'huile de coton contenant une certaine dose d'antagoniste. Cette première administration est toujours suivie de :

- 0,25 cm³ d'huile de coton contenant en dissolution le cholestérol -4-C¹⁴ et 4 mg de cholestérol ordinaire comme entraîneur.

Ces quantités sont celles utilisées par CHAIKOFF, HERNANDEZ et Coll. (43).

Pour faire ingérer au Rat, ces volumes très précis, on introduit jusqu'à son estomac, une sonde de caoutchouc très fine (n° 7). Grâce à un écarteur de bois, on évite que l'animal ne morde la sonde et la déchire.

La sonde a été au préalable, raccordée à une seringue à insuline de 1 cm³, divisée au 1/100, et remplie de la solution huileuse.

En l'absence de toute résistance anormale, on injecte lentement le liquide, puis la sonde est retirée.

3) Récolte des matières fécales

Sitôt l'ingestion du repas-test, les animaux qui auparavant étaient groupés, sont mis en cages individuelles numérotées.

Ils reçoivent à volonté du régime synthétique et de l'eau.

Leurs matières fécales sont récoltées soigneusement aussi longtemps que dure l'expérience de bilan.

B - METHODES CHIMIQUES SPECIALES -

1 - TRAITEMENT DES MATIERES FECALES EN VUE DE L'EXTRACTION DE LA RADIOACTIVITE -

Les fèces sont broyées en présence d'un peu d'alcool et soumises à une extraction à l'alcool à 95° bouillant, durant 8 heures dans des appareils de Kumagawa.

Ceux-ci sont montés en série et permettent de traiter simultanément 6 épreuves de bilans.

Nous avons choisi comme solvant l'alcool à 95°. Des essais avec d'autres solvants plus volatils présentaient des difficultés techniques.

L'alcool a l'avantage de ne pas bouillir dans les cartouches et cependant, chauffé par l'intermédiaire de bains de sable, il assure des siphonnages, à la fois rapides et réguliers.

Nous avons chronométré, à titre d'exemples les siphonnages effectués à des moments différents de la journée par un appareil.

Ces temps étaient :

10 h.	2 h.
10 h.4'	2 h. 4'
10 h.8'	2 h. 8'
10h.11'	2 h.12'
10h.15'	2 h.16'
10h.20'	2 h.20'
10h.24'	2 h.24'
10h.28'	2 h.28'
10h.32'	2 h.31'
10h.36'	2 h.34'
10h.40'	2 h.38'
10h.44'	2 h.42'
10h.48'	2 h.46'

10h.52	2h.50
	2h.54
-----10h.56-----	-----2h.57-----
soit 15 siphonnages	16 siphonnages
en 1 heure	en 1 heure

En général, il se produit régulièrement un siphonnage toutes les quatre minutes.

Nous avons voulu nous assurer qu'après 8 heures, toutes les substances alcoolosolubles étaient bien extraites.

6 cartouches, traitées la veille, sont soumises à nouveau à l'action de l'alcool bouillant durant 8 heures.

Un comptage permet de voir qu'elles contiennent chacune, au total, après cette 2ème extraction :

1100 c/min.
1700
1900
2000
1500
1300

alors que la veille, la première extraction a donné des valeurs de l'ordre de 350.000 c/min. par cartouche.

La radioactivité demeurant dans les fèces, après un traitement au Kumagawa durant 8 heures est donc tout à fait négligeable. On peut considérer que toutes les substances alcoolosolubles sont extraites.

2 - EVALUATION DE LA RADIOACTIVITE TOTALE DE L'EXTRAIT -

Après refroidissement des appareils de Kumagawa, les solutions alcooliques obtenues sont transférées dans des flacons jaugés et amenées à un volume constant de 250 cm³ à l'aide d'alcool à 95°.

Ces solutions contiennent le cholestérol non absorbé, les stérols qui en dérivent et les sels biliaires radioactifs déjà éliminés par la bile.

Des substances étrangères au cholestérol ou à son métabolisme sont extraites en même temps, ainsi que des pigments brunâtres. Ces corps sont sans intérêt pour notre recherche.

Si nous voulons effectuer un comptage direct de la radioactivité totale des extraits (par évaporation d'une partie aliquote sur cupule d'aluminium), nous obtenons un résidu important pondéralement, donc à grosse self-absorption. De plus, les pigments brunâtres donnent un dépôt à aspect vernissé, mal réparti sur la surface de la cupule, ce qui entraîne des comptages irréguliers et infidèles.

Pour éviter cet inconvénient et réduire l'importance du dépôt, une portion connue de solution alcoolique = 2 cm³, est évaporée dans un petit erlen. Le résidu sec est repris par 10 cm³ de chloroforme pur.

Après agitation, on obtient une solution chloroformique diluée, contenant le 1/5ème des éléments radioactifs de l'extrait primitif. Une portion aliquote (2 cm³) prélevée sur cupule d'aluminium donne un dépôt de comptage reproductible et permet de connaître la "radioactivité totale" de l'extrait = cholestérol-4-C¹⁴ et produits de transformation radioactifs éliminés par le rat.

Chacun des dépôts de la solution chloroformique ayant un pouvoir d'autoabsorption, il est nécessaire d'établir une

- courbe d'autoabsorption -

permettant de connaître les corrections à effectuer à chaque comptage.

Pour ce faire, nous mettons un rat de 200 g. au régime CHAIKOFF. Les matières fécales recueillies et pulvérisées sont extraites à l'alcool à 95° durant 48 heures dans un Kumagawa.

L'extrait obtenu est évaporé dans un gros erlen et repris au chloroforme. Ces différentes opérations étant faites d'une manière uniquement qualitative.

Pour connaître la teneur en résidu sec de la solution chloroformique obtenue, on en prélève 2 cm³ sur des cupules tarées.

On évapore, on sèche au dessiccateur à P₂O₅, puis on pèse ces cupules :

2 cm³ donnent des poids de 16,68 mg

16,78 mg

Connaissant cela, nous réalisons un système de dilutions successives de la solution mère, à l'aide de chloroforme.

Nous préparons, d'autre part, une solution de cholestérol-4-C¹⁴, titrant 9.200 coups en 5 minutes.

Sur des cupules tarées, nous déposons 1 cm³ de cette solution. Nous faisons évaporer. Puis nous ajoutons des volumes variables des dilutions successives de la solution chloroformique non radioactive.

De cette manière, après évaporation et dessiccation, nous obtenons une série de dépôts dont les poids secs et les comptages sont consignés dans le tableau n° 22.

Il est facile de déduire pour chaque dépôt le pourcentage de radioactivité retrouvée.

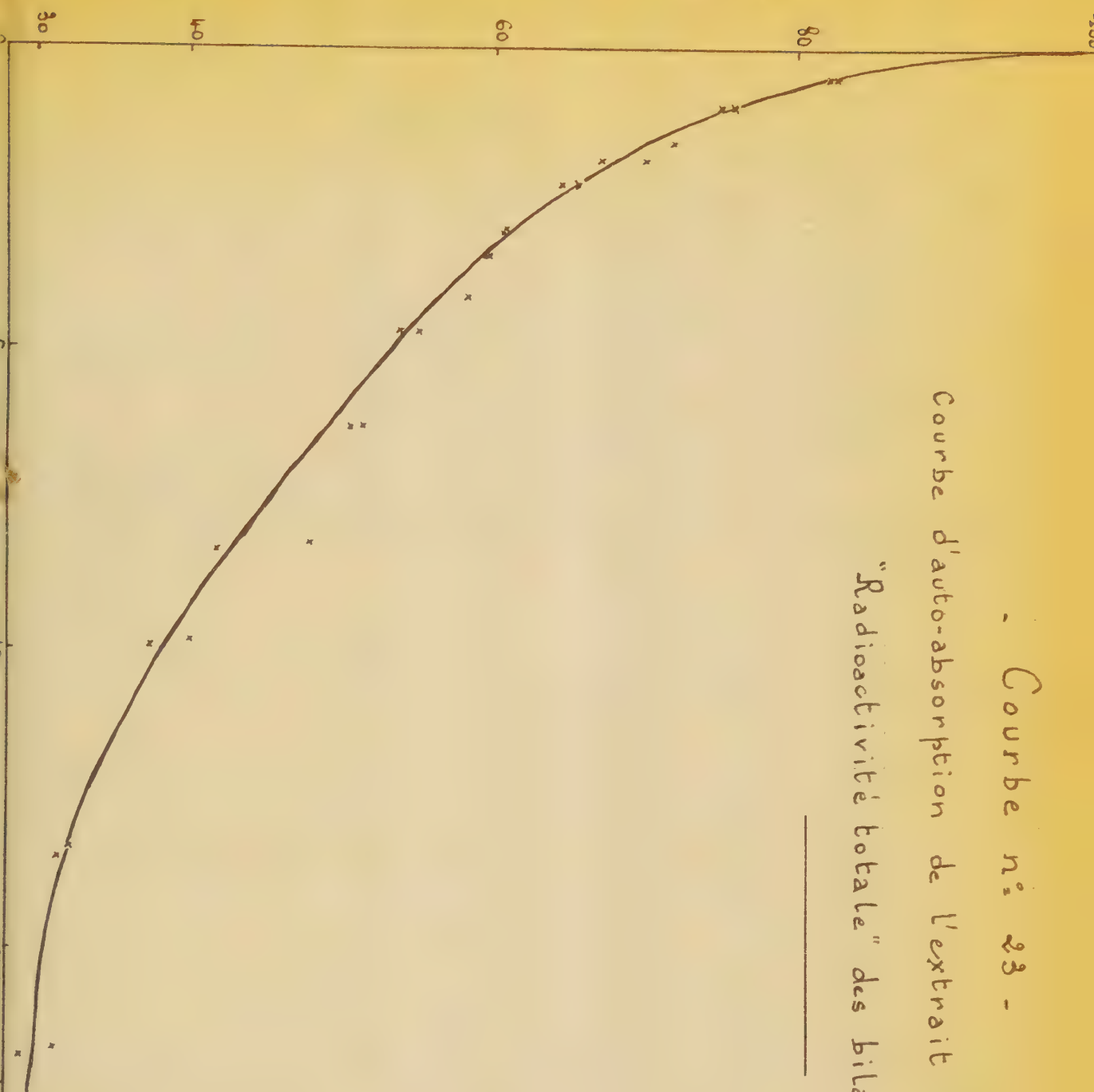
Les valeurs obtenues permettent l'établissement d'une courbe d'autoabsorption (courbe n° 23) qui servira à corriger les comptages effectués dans les mêmes conditions au cours des expériences.

3 - EVALUATION DU CHOLESTEROL-4-C¹⁴ NON ABSORBE -

Comme nous l'avons expliqué page 93 , le cholestérol non absorbé est en fait exprimé par l'ensemble des stérols radioactifs retrouvés dans les fèces.

Il a été largement démontré que l'estérification des stérols

% de radioactivité transmise



Courbe n° 23 -
"Radioactivité totale" des bilans fécaux

TABLEAU N° 22

	P	n	%
Radioactivité introduite au départ dans toutes les cupules 9.200c/ en 5 min.	0,50	7.555	82,1
	0,50	7.605	82,7
	0,98	6.979	75,8
	0,96	6.894	75
	1,53	6.610	71,85
	1,54	6.616	71,9
	1,86	6.444	70
	1,86	6.151	66,9
	2,25	5.921	64,4
	2,23	6.027	65,5
	3	5.589	60,8
	3,07	5.577	60,6
	3,45	5.482	59,6
	4,13	5.363	58,3
	4,71	5.048	54,9
	4,72	4.940	53,7
	6,31	4.737	51,5
	6,32	4.642	50,5
	8,27	4.409	47,9
	8,37	3.832	41,7
	9,86	3.670	39,9
	9,91	3.446	37,5
	13,48	2.889	31,4
	13,30	2.959	32,1
	16,68	2.873	31,2
	16,76	2.678	29,1

Dans ce tableau :

- P - correspond au poids en mg du résidu sur la cupule
- n - correspond à la radioactivité mesurée au compteur et exprimée en nombre d'impulsions en 5 minutes; mouvement propre déduit.
- % - est le pourcentage de radioactivité mesurée.

n'est pas nécessaire à leur fixation par la muqueuse intestinale et qu'elle n'a pas lieu dans la lumière de l'intestin. (58, 28, 37, 38, 39, 40).

De ce fait, les stérols peuvent être séparés des produits de la transformation hépatique du cholestérol tels que les sels biliaries, sans avoir recours à une saponification préalable.

Les stérols fécaux, en raison de leur fonction alcool en position 3 et de leur disposition stérique, sont précipitables par la digitonine (COLEMAN et WELLS) (17)

Pour les isoler de l'extrait alcoolique total, il suffit de faire agir le glucoside et de déterminer la radioactivité du précipité ainsi obtenu.

Nous opérons de la manière suivante :

Nous reprenons par 10 cm³ de chloroforme le résidu de dessiccation de 2 cm³ d'extrait alcoolique de matières fécales.

Nous prélevons dans des tubes à précipiter 5 cm³ de la solution chloroformique obtenue.

Le solvant étant évaporé, nous procédons exactement comme il a été décrit au début de ce travail au chapitre des techniques générales :

- dissolution dans 5 cm³ d'alcool-acétone
- addition de digitonine et séjour de 16 heures en jarre fermée.

Le précipité obtenu, lavé et séché, est dissous dans de l'alcool méthylique; une partie aliquote est alors déposée sur cupule.

La seule particularité réside dans la correction des comptages pour l'autoabsorption.

Nous ne pouvons appliquer la technique colorimétrique de SPERRY et WEBB pour évaluer la teneur en stérols totaux de chacune des cupules. Les matières fécales recèlent des stérols : (COLEMAN et WELLS (17):

(à Lieberman négatif ou presque (cholestanol:7 à 8%)
(
(à Lieberman lent
(à Lieberman rapide

Par contre, tous ces stérols précipitent à la digitonine.

Aussi, dans cette troisième partie et dans la suivante, nous baserons la correction de l'autoabsorption sur la pesée directe des cupules contenant le complexe digitonique.

Nous établissons une nouvelle courbe d'autoabsorption en portant sur un graphique :

- en abscisse : les poids des précipités de complexe digitonine-cholestérol exprimés en mg.
- en ordonnée : les pourcentages de radioactivité retrouvée dans chacun des cas.

Pour ce faire :

- Sur une série de cupules d'aluminium tarées, nous plaçons :
- des doses constantes de solution de cholestérol-4-C¹⁴
(1900 c/min.)

Puis nous ajoutons :

- des quantités croissantes d'une solution méthylque de complexe digitonine-cholestérol ordinaire. Cette solution est obtenue en précipitant les stérols fécaux d'un rat témoin.
- 1 goutte de solution de sels biliaires.

Après dessiccation, nous pesons les cupules et nous mesurons leur radioactivité. Ce qui nous permet d'obtenir les résultats résumés dans le tableau n° 24 et d'établir une courbe d'autoabsorption (N° 25).

Dans le tableau n° 24 :

- P - correspond au poids en mg du complexe digitonique déposé sur la cupule.
- n - correspond à la radioactivité mesurée au compteur et exprimée en nombre d'impulsions par minute, mouvement propre déduit.
- % est le pourcentage de radioactivité retrouvée.

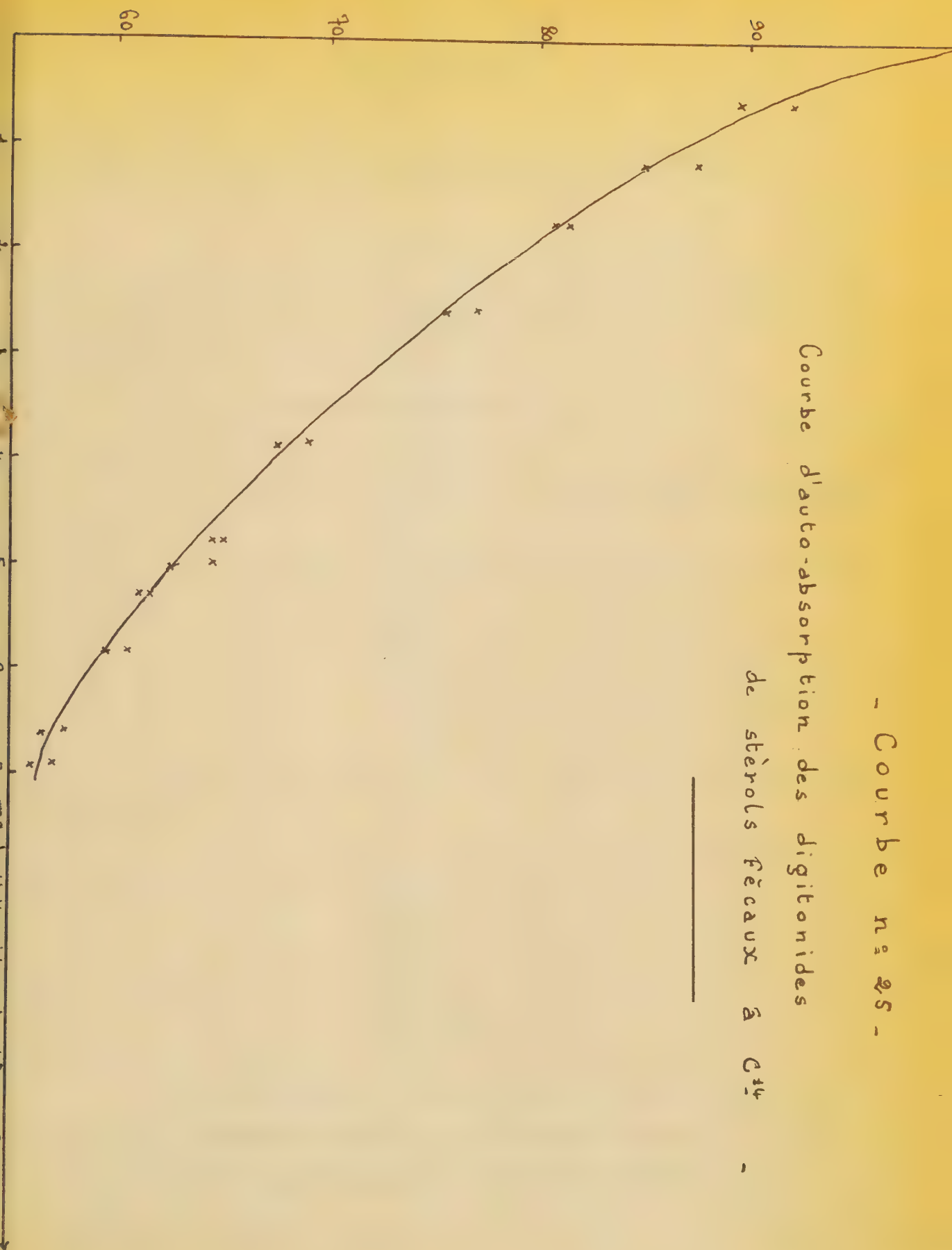
TABLEAU N° 24

	P	n	%
	0,62	I700	89,5
	0,61	I748	92
	1,17	I662	87,5
	1,19	I615	85
	1,75	I533	80,7
	1,75	I546	81,4
	2,60	I434	75,5
	2,57	I463	77
Radioactivité introduite au départ dans toutes les cu- pules	3,88	I.282	67,5
	3,85	I.311	69
	4,79	I.235	65
	4,80	I.226	64,5
1900 c/min.	5	I.223	64,5
	5,05	I.188	62,5
	5,31	I.168	61,5
	5,31	I.159	61
	5,85	I.147	60,4
	5,86	I.130	59,5
	6,6	I.092	57,5
	6,64	I.068	56,2
	6,95	I.064	56
	6,92	I.083	57

Dans les expériences, il suffit de peser les cupules de complexe digitonique et de se référer à la courbe pour connaître la correction à appliquer au comptage. Cette technique supprime toute la colorimétrie, elle est donc, en définitive, beaucoup plus rapide pour nous.

% de radioactivité transmise

- Courbe n° 25 -
de stérols fécaux à C¹⁴ -



LES EXPERIENCES

ETUDE CINETIQUE DE L'ABSORPTION INTESTINALE DU CHOLESTEROL -

Nous avons vu le sort complexe du cholestérol soumis au cycle entérohépatique. C'est une raison pour limiter une expérience de bilan au seul temps nécessaire à l'absorption d'une dose de cholestérol-4-C¹⁴ administrée en une seule fois.

Afin de connaître exactement ce temps, il nous a semblé important d'étudier la cinétique de l'absorption du cholestérol-4-C¹⁴.

Pour ce faire, nous utilisons 36 rats répartis en 9 séries de 4 animaux.

Ils sont soumis au régime CHAIKOFF durant 15 jours, puis chacun d'entre eux reçoit un repas-test constitué de :

(0,25 cm³ d'huile de coton contenant
(- 4 mg de cholestérol ordinaire comme
(entraîneur
(- du cholestérol-4-C¹⁴ dont l'activité
(correspond à 500.000 c/min.
(

Après des temps variés, les animaux sont sacrifiés par décapitation :

ceux de la 1ère série =	1h,30'	après le repas-test
"	2ème série =	3h.
"	3ème série =	6h.
"	4ème série =	9h.
"	5ème série =	12 h.
"	6ème série =	15 h.
"	7ème série =	24 h.
"	8ème série =	36 h.
"	9ème série =	48 h.

Les intestins sont prélevés sur toute leur longueur. On les lave soigneusement, comme dans les expériences "in vitro" à l'aide d'une solution ClNa (9 p.1000) et glucose (3 p.1000). On les saponifie.

Etant donné que nous nous livrons à une étude assez détaillée de l'absorption intestinale et de ses manifestations, il nous paraît intéressant de voir ce qui se passe dans les foies parallèlement aux intestins.

A cet effet, les foies sont prélevés, pesés. Deux échantillons de 500 mg sont soumis à la saponification.

Des deux organes, on extrait la radioactivité totale par la méthode de BARUCH et CHAIKOFF (3), puis on isole le cholestérol-4-C¹⁴ par précipitation à la digitonine.

Pour chaque série de rats, nous avons réuni les résultats expérimentaux sous forme de tableaux numérotés de 26 à 35, et nous avons établi deux graphiques (N° 36 et 37).

En ce qui concerne les résultats obtenus dans l'intestin :

Si l'on transcrit sur un graphique, les pourcentages de cholestérol trouvés en fonction du temps, on s'aperçoit qu'il y a une fixation immédiate et très importante du cholestérol par l'intestin (1h 30 - 3 heures).

Après cette période de saturation intensive, il semble y ^{un} avoir fléchissement dans la fixation du cholestérol (6 heures).

Puis l'absorption reprend à un taux fort (9 heures) mais non comparable à celui du premier clocher.

de 9 heures à 48 heures, on note une régression progressive du travail intestinal.

A la fin de l'expérience, l'absorption semble encore se poursuivre, mais d'une façon très réduite.

A aucun moment, il n'est noté de différence entre la radioactivité totale et celle du cholestérol-4-C¹⁴ isolé.

L'intestin ne semble donc pas fabriquer de sels biliaires ou de corps non précipitables à la digitonine. Il ne contient que du cholestérol-4-C¹⁴ ou des stérols très voisins réagissant comme lui.

L'étude accessoire du foie montre que très vite la teneur en cholestérol-4-C¹⁴ de cet organe augmente. Dès 3 heures, elle atteint presque un maximum. Ce maximum semble avoir lieu aux environs de 6 à 9 heures. Il se maintient pratiquement jusqu'à 12 heures.

Après 12 heures, une chute assez brutale de la teneur en C¹⁴ semble montrer que le foie réagit vigoureusement et tend à éliminer le cholestérol qu'il avait stocké et celui qui continue à lui être amené.

Passées 15 heures, la radioactivité de l'organe diminue très progressivement.

Nous remarquons que la radioactivité du foie est uniquement sous forme de cholestérol-4-C¹⁴ durant les 6 premières heures.

Au contraire, à partir de 9 heures, une différence entre la mesure de la radioactivité des lipides totaux et celle du cholestérol prouve que le foie a commencé à transformer le cholestérol qui lui est amené à en faire des sels biliaires.

L'information apportée par cette expérience montre encore combien peut être faussée l'appréciation de l'absorption intestinale du cholestérol basée uniquement sur l'évaluation de la teneur en stérol C¹⁴ du foie.

Cet organe stocke du cholestérol mais il en élimine aussi rapidement de grosses quantités sous forme de sels biliaires.

Les résultats de cette expérience de cinétique sont en accord avec ceux de SWELL et coll. (84). Les auteurs administrent du cholestérol-4-C¹⁴ à des rats ayant des fistules lymphatiques.

Dans leurs essais, l'apparition du cholestérol-4-C¹⁴ dans la lymphe est rapide. Le "peak" de l'absorption se situe entre 6 et 8 heures. Après 12 heures, la lymphe reprend déjà son aspect clair post-absorptif, mais le cholestérol-4-C¹⁴ continue à apparaître en légères quantités au-delà de 48 heures.

En conclusion. -

L'étude de la teneur en cholestérol-4-C¹⁴ de l'intestin montre que l'absorption intestinale du stérol commence très vite après l'ingestion, mais se poursuit assez longtemps.

Si nous voulons établir un bilan du cholestérol digéré par le Rat, il semble bon de prolonger l'expérience durant 48 heures.

En mesurant la radioactivité rejetée dans les fèces, après ce temps, on peut espérer avoir un tableau assez juste du sort du cholestérol.

Les sels biliaires, fabriqués par le foie après 9 heures, sont certainement déversés par la bile dans l'intestin. Ils ne nous gêneront pas puisqu'ils ne précipitent pas à la digitonine comme les stérols.

TABLEAU N° 26

Rat n°	Poids du rat	Poids du foie	- F O I E S -				- I N T E S T I N S -			
			Lipides totaux à C ¹⁴		Cholestérol-4-C ¹⁴		Lipides totaux à C ¹⁴		Cholestérol-4-C ¹⁴	
			cps/min.	%	cps/min.	%	cps/min.	%	cps/min.	%
I	203 ^{g.}	78,40	778	0,15	740	0,15	53.000	10,6	51.500	10,3
II	197	9,18	8.000	1,6	7.350	1,5	54.500	10,9	54.000	10,8
III	189	6,98	3.420	0,7	3.630	0,7	75.000	15	74.200	15
IV	165	6,84	4.420	0,9	4.400	0,9	68.500	13,7	70.000	14
Meyennes			0,8 %		0,8 %		12,5 %		12,5 %	

RADIOACTIVITE RETROUVEE 3 heures APRES L'INGESTION DU REPAS-TEST

(Cholestérol -4-C¹⁴ = 500.000 cps/min.)

TABLEAU N° 27

Rat n°	Poid du rat	Poids du foie	- F O I E S -		- I N T E S T I N S -	
			Lipides totaux à C ¹⁴	Cholestérol-4-C ¹⁴	Lipides totaux à C ¹⁴	Cholestérol-4-C ¹⁴
			cps/min.	%	cps/min.	%
I	219 g	9 g 02	29.300	5,9	65.550	13,1
II	192	8,37	47.300	9,5	48.000	9,6
III	195	8,35	34.100	6,8	54.000	10,8
IV	214	8,22	55.000	11	64.350	12,9
Moyennes			8,3 %		11,8 %	

RADIOACTIVITE RETROUVEE 6 heures APRES L'INGESTION DU REPAS-TEST

(Cholestérol-4-C¹⁴ = 500.000 cps/min.)

TABLEAU N° 28

TABLEAU N° 28			- F O I E S -				- I N T E S T I N S -						
Rat n°	Poids du rat	Poids du foie	Lipides totaux à C ¹⁴			Cholestérol-4-C ¹⁴		Lipides totaux à C ¹⁴			Cholestérol-4-C ¹⁴		
			cps/min.	%		cps/min.	%	cps/min.	%	cps/min.	%		
I	168 g	7g 15	36.000	7,2		36.100	7,2	34.000	6,8	33.000	6,6		
II	173	8	39.860	8		43.200	8,6	7.000	1,4	6.600	1,4		
III	161	7,6	46.200	9,2		48.000	9,6	22.300	4,5	22.800	4,5		
IV	158	6,44	62.400	12,5		62.500	12,5	13.200	2,6	13.500	2,7		
Moyennes			9,2 %			-----			-----			3,8 %	

RADIOACTIVITE RETROUVEE 9 heures APRES L'INGESTION DU REPAS-TEST

(Cholestérol -4-C¹⁴ = 500.000 cps/min.)

TABEAU N° 29

TABLEAU N° 29			- F O I E S -				- I N T E S T I N S -			
Rat n°	Poids du rat	Poids du foie	Lipides totaux à C ¹⁴		Cholestérol-4-C ¹⁴		Lipides totaux à C ¹⁴		Cholestérol-4-C ¹⁴	
			cps/min.	%	cps/min.	%	cps/min.	%	cps/min.	%
I	220 g	8g. 69	59.500	11,9	53.500	10,7	62.500	12,5	58.400	11,7
II	214	7,3	68.400	13,7	67.600	13,5	33.000	6,6	33.100	6,6
III	224	7,87	23.600	4,7	18.200	3,6	18.700	3,7	18.000	3,6
IV	213	7,13	49.800	10	37.000	7,4	26.000	5,2	26.000	5,2
Moyennes			10 %		8,8 %		7 %		6,8 %	

(Cholestérol $-4-C^{14}$ = 500.000 cps/min.)

TABLEAU N° 30

Rat n°	Poids du rat	Poids du foie	- F O I E S -				- I N T E S T I N S -			
			Lipides totaux à C^{14}		Cholestérol $-4-C^{14}$		Lipides totaux à C^{14}		Cholestérol $-4-C^{14}$	
			cps/min.	%	cps/min.	%	cps/min.	%	cps/min.	%
I	196 g	8g.81	45.300	9,1	41.000	8,2	21.200	4,2	21.600	4,3
II	198	8,86	55.000	11	50.200	10	24.400	4,9	26.500	5,3
III	182	8,47	39.800	8	36.000	7,2	20.000	4	20.400	4
IV	174	9,07	49.000	9,8	45.900	9,2	26.500	5,3	26.600	5,3
Moyennes			9,5 %		8,65 %		4,6 %		4,7 %	

(Cholestérol -4-C¹⁴ = 500.000 cps/min.)

TABLEAU N° 31

TABLEAU N° 31			- F O I E S -				- I N T E S T I N S -			
Rat n°	Poids du rat	Poids du foie	Lipides totaux à C ¹⁴		Cholestérol-4-C ¹⁴		Lipides totaux à C ¹⁴		Cholestérol-4-C ¹⁴	
			cps/min.	%	cps/min.	%	cps/min.	%	cps/min.	%
I	223 g	8g. 84	31.000	6,2	28.700	5,7	28.000	5,6	30.400	6,1
II	188	6,86	37.000	7,4	32.600	6,5	8.000	1,6	8.200	1,6
III	186	7,29	27.000	5,4	24.800	5	18.200	3,6	18.100	3,6
IV	202	10,7	39.000	7,8	33.700	6,7	20.300	4,1	20.450	4,1
Moyennes			6,7 %		5,8 %		3,7 %		3,8 %	
			-----		-----		-----		-----	

RADIOACTIVITE RETROUVEE 24 heures APRES L'INGESTION DU REPAS-TEST

(CHOLESTEROL-4-C¹⁴ = 500.000 cps/min.)

TABLEAU N° 32

Rat n°	Poids du rat	Poids du foie	- F O I E S -				- I N T E S T I N S -			
			Lipides totaux à C ¹⁴		Cholestérol -4-C ¹⁴		Lipides totaux à C ¹⁴		Cholestérol-4-C ¹⁴	
			cps/min.	%	cps/min.	%	cps/min.	%	cps/min.	%
I	206 ^g .	7,9 ^g	21.100	4,2	11.900	2,4	-	-	14.250	2,85
II	205	8,5	31.500	6,3	18.550	3,7	-	-	22.000	4,4
III	223	8,63	-	-	49.000	9,8	12.450	2,5	12.360	2,5
IV	234	8,67	35.800	7	27.100	5,4	11.250	2,28	11.400	2,28
Moyennes ...			5,8 %		5,4 %		3 %		3 %	

(CHOLESTEROL-4-C¹⁴ = 500.000 cps/min.)

TABLEAU N° 33

			- F O I E S -				- I N T E S T I N S -			
Rat n°	Poids du rat	Poids du foie g	Lipides totaux à C ¹⁴		Cholestérol-4-C ¹⁴		Lipides totaux à C ¹⁴		Cholestérol-4-C ¹⁴	
			cps/min.	%	cps/min.	%	cps/min.	%	cps/min.	%
I	181 ^g	7,51	33.100	6,6	30.800	6,1	17.000	3,4	13.000	2,6
II	252	10,49	27.000	5,4	24.900	5	11.500	2,3	10.500	2,1
III	175	6,71	26.500	5,3	24.800	4,9	15.300	3	15.300	3
IV	173	6,62	27.500	5,5	24.600	4,9	12.300	2,5	12.500	2,5
Moyennes			5,7 %		5,2 %		2,8 %		2,5 %	

(Cholestérol -4-C¹⁴ = 500.000 cps/min.)

TABLEAU N° 34

Rat n°	Poids du rat	Poids du foie	- F O I E S -			- I N T E S T I N S -		
			Lipides totaux à C ¹⁴		Cholestérol -4-C ¹⁴	Lipides totaux à C ¹⁴		Cholestérol -4-C ¹⁴
			cps/min	%	cps/min	cps/min	%	cps/min
I	186 ^g	7,15 ^g	15.300	3,1	13.600	5.750	1,15	5.750
II	191	9,3	27.900	5,6	26.400	9.350	1,9	9.400
III	182	7,2	32.500	6,5	31.300	9.700	1,9	9.600
IV	196	8,75	16.650	3,3	15.150	5.300	1	4.070
Moyennes			4,6 %		4,3 %		1,5 %	
							1,5 %	

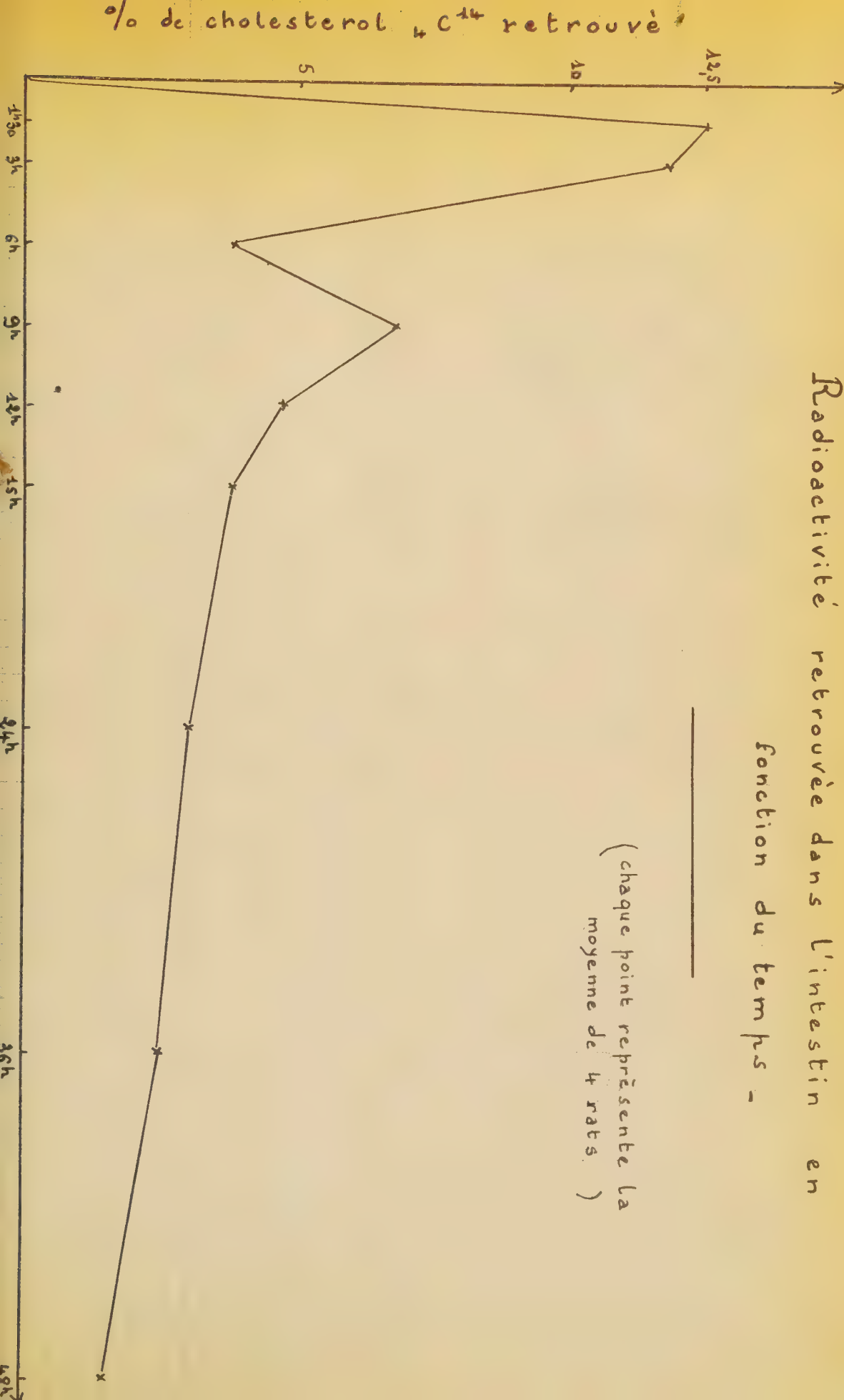
TABLEAU N° 35

	1 ^h , 30	3 h.	6 h.	9 h.	12 h.	15 h.	24 h.	36 h.	48 h.
FOIES	Lipides totaux ¹⁴ à C	5,9 9,5 6,8 11	7,2 8 9,2 12,5	11,9 13,7 4,7 10	9,1 11 8 9,8	6,2 7,4 5,4 7,8	4,2 6,3 - 7	5,5 5,3 5,4 6,6	3,1 5,6 6,5 3,3
	Cholestérol ¹⁴ 4-C								
	$\bar{M} = 0,8\%$	$\bar{M} = 8,3\%$	$\bar{M} = 9,2\%$	$\bar{M} = 10\%$	$\bar{M} = 9,5\%$	$\bar{M} = 6,7\%$	$\bar{M} = 5,8\%$	$\bar{M} = 5,7\%$	$\bar{M} = 4,6\%$
INTES- TINS	Lipides totaux à C ¹⁴	13,1 9,6 10,8 12,9	1,4 2,6 4,5 6,8	12,5 6,6 3,7 5,2	4,2 4,9 4 5,3	5,6 1,6 3,6 4,1	2,25 2,28	3,4 2,3 3 2,5	1,15 1,9 1,9 1
	Cholestérol ¹⁴ 4-C ¹⁴								
	$\bar{M} = 12,5\%$	$\bar{M} = 11,8\%$	$\bar{M} = 3,8\%$	$\bar{M} = 7\%$	$\bar{M} = 4,6\%$	$\bar{M} = 3,7\%$	$\bar{M} = 3\%$	$\bar{M} = 2,8\%$	$\bar{M} = 1,5\%$
	10,6 10,9 15 13,7		6 1,26 4,5 2,65	11,7 6,6 3,6 5,2	4,25 5,3 4,2 5,3	6,1 1,6 3,6 4,1	2,85 4,4 2,5 2,3	3 2,1 2,6 2,5	1,15 1,9 1,9 0,8
	$\bar{M} = 12,5\%$		$\bar{M} = 3,8\%$	$\bar{M} = 6,8\%$	$\bar{M} = 4,7\%$	$\bar{M} = 3,8\%$	$\bar{M} = 3\%$	$\bar{M} = 2,5\%$	$\bar{M} = 1,5\%$

- Graphique n° 36 -

Radioactivité retrouvée dans l'intestin en
fonction du temps -

(chaque point représente la
moyenne de 4 rats)



B - EVALUATION DE L'ABSORPTION INTESTINALE DU CHOLESTEROL -4-C¹⁴ CHEZ LE RAT -

Les modalités d'établissement des bilans fécaux sont maintenant arrêtées de par les expériences précédentes.

Un point reste à fixer : faut-il se contenter de récolter les matières fécales éliminées par les animaux durant les 48 heures qui suivent l'ingestion d'une dose de cholestérol -4-C¹⁴ et en déterminer la radioactivité ?

Nous pensons qu'il peut y avoir des différences considérables dans le comportement mécanique des intestins. Les fèces peuvent séjourner durant des temps plus ou moins longs dans le colon et le gros intestin.

La masse des matières fécales et, en conséquence, la radioactivité éliminées en 2 jours, varient ainsi énormément selon les individus. Nous risquons d'observer des différences de bilans n'ayant aucun rapport avec l'absorption intestinale réelle.

Afin d'éviter cet écueil, il nous paraît indispensable de faire porter l'extraction sur la totalité des matières fécales (fèces éliminées et contenu intestinal) et nous décidons, une fois pour toutes d'inclure dans la masse des stérols fécaux, ceux de la paroi intestinale; on peut, en effet, considérer ces derniers comme n'étant pas encore assimilés par l'organisme.

Nous sacrifions donc l'animal 48 heures après l'ingestion du cholestérol. Nous pratiquons l'extraction au Kumagawa sur l'intestin et son contenu, auxquels nous joignons les matières fécales éliminées durant les 48 heures.

L'expérience est faite sur 3 lots de 3 rats, d'un poids voisin de 200 grammes.

Après 15 jours de régime CHAIKOFF, les animaux reçoivent,

sans jeûne préalable, un repas-test constitué de :

- (-0,25 cm³ d'huile de coton suivi de
- (
- (-0,25 cm³ d'huile de coton contenant :
- (
- (- 4 mg de cholestérol ordinaire comme entraîneur
- (
- (- du cholestérol-4-C¹⁴ correspondant à
- (
- (560.000 c/min.
- (

48 heures exactement après le tubage gastrique, les rats sont sacrifiés par décapitation.

- On prélève les foies et on les pèse. On en extrait deux échantillons qui sont saponifiés et traités selon la méthode de BARUCH et CHAIKOFF.

- Les intestins et leur contenu sont joints aux matières fécales des 48 heures trouvées dans les cages individuelles. Le tout, pulvérisé, est extrait par l'alcool bouillant au Kumagawa.

Ces opérations nous permettent de connaître la teneur en lipides et en cholestérol radioactifs du foie et des fèces de chaque animal.

Les résultats obtenus (6) sont consignés dans le tableau n° 38.

On y peut voir que :

- 4,8 % du C¹⁴ ingéré est retrouvé dans le foie des animaux, dans la fraction "lipides totaux". La précipitation à la digitonine n'isole que 3,6 % de cholestérol-4-C¹⁴.

Le quart de la radioactivité du foie se trouve donc sous forme de sels biliaires dérivant du cholestérol absorbé.

- dans les matières fécales, la présence de 30 % environ de stérols à C¹⁴ donne à penser que l'absorption du cholestérol-4-C¹⁴ administré à l'animal a eu lieu dans la proportion de 70 % (100-30).

De la radioactivité du stérol ingéré, 36% est déjà retrouvée dans les matières fécales sous forme de sels biliaires. L'organisme semble se débarrasser très rapidement du cholestérol exogène absorbé.

Nous venons d'énoncer les résultats obtenus chez des rats soumis à un régime normal, équilibré et étudiés dans des conditions physiologiques.

Ces chiffres sont en accord avec ceux trouvés par BURKE et coll.(11) chez des rats soumis à un régime riche en cholestérol et par BUGNARD et coll.(10) chez des rats carencés en lipides et en cholestérol.

On peut conclure de l'ensemble de ces résultats que le régime alimentaire, en particulier sa richesse en cholestérol n'exerce aucune action sur l'absorption intestinale du stérol.

Ceci semble normal, si l'on veut bien se souvenir des valeurs élevées qu'il faut administrer aux animaux : 100 mg et au-delà (FAVARGER(66-27) - LIN(52) pour atteindre les limites de capacité d'absorption du cholestérol.

Nos résultats, par contre, diffèrent notablement de ceux obtenus sur la lymphe par HERNANDEZ et coll.(43).

En 48 heures, ces auteurs n'y retrouvent que 25 à 37% du stérol administré.

Cette différence peut s'expliquer par l'impossibilité d'une récolte quantitative de la lymphe et surtout par des conditions expérimentales artificielles, très éloignées des conditions physiologiques dans lesquelles cette recherche a été effectuée.

En conclusion :

=====

L'étude de l'absorption intestinale du cholestérol par la méthode des bilans montre, chez le rat normal, une absorption importante, atteignant 70 % de la dose administrée et indépendante du régime.

C - MESURE DE L'EFFET ANTAGONISTE DU SITOSTEROL -

Nous voulons chiffrer cette inhibition, par rapport aux valeurs trouvées au chapitre précédent.

Dans une expérience identique, nous administrons, par sonde stomacale, à trois lots de trois rats, un repas-test constitué, cette fois de :

- (--0,25 cm³ d'huile de coton contenant
- (25 mg de β -sitostérol, suivi de :
- (--0,25 cm³ d'huile de coton additionnée
- (- de cholestérol-4-C¹⁴ dont l'activité
- (correspond à 560.000 c/min.
- (
- (- de 4 mg de cholestérol entraîneur

48 heures plus tard, les animaux sont sacrifiés par décapitation.

Les foies, les matières fécales et le contenu intestinal sont traités comme précédemment.

Les résultats expérimentaux obtenus sont groupés dans le tableau n° 39.

On y peut voir que :

environ 3,4 % du C¹⁴ ingéré est retrouvé dans la fraction "lipides totaux" du foie.

La digitonine permet de séparer 2,5 % représentés par du cholestérol -4 -C¹⁴.

Cette fois encore, un quart de la radioactivité du foie est sous forme de sels biliaires, 48 heures après le début de l'expérience.

Les dépôts de "lipides totaux" et de cholestérol radioactifs sont diminués de 30 % par rapport à l'expérience témoin sans sitostérol. Ils conservent tout de même une certaine importance.

Dans les matières fécales, les stérols retrouvés, montrent que, par différence, 56 % du cholestérol-4-C¹⁴ a été résorbé.

Ceci malgré la présence d'une dose 6 fois supérieure de β -sitostérol.

La radioactivité des sels biliaires des matières fécales prouve que 33 % du cholestérol-4-C¹⁴ ingéré initialement, après avoir été résorbé, a déjà ^{été} éliminé de l'organisme par le foie. Ce chiffre est sensiblement le même que dans l'expérience témoin sans sitostérol.

En conclusion, nous pouvons dire que :

L'administration simultanée de cholestérol et de sitostérol, dans le rapport 1/6, est suivie d'une baisse de l'absorption du cholestérol : celle-ci passe de 70 à 56 %.

Une baisse analogue, mais d'un degré moindre, a été signalée par BURKE chez des rats soumis préalablement à un régime riche en cholestérol (11).

L'effet obtenu dans notre travail est cependant nettement inférieur à celui trouvé par HERNANDEZ(43). Mais les critiques, faites précédemment au travail de ces auteurs, s'appliquent aussi à leurs études sur l'effet du sitostérol.

D'autre part, il n'est pas possible de superposer nos résultats à ceux fournis par la mesure de la cholestérolémie post-prandiale chez le Lapin et le Poulet : celle-ci avait fait apparaître une action antagoniste du sitostérol plus puissante que celle observée chez le Rat.

IVème PARTIE

ETUDE DE L'ACTION DE QUELQUES COMPOSES STEROLIQUES

SUR L'ABSORPTION INTESTINALE DU CHOLESTEROL

Ayant obtenu une vue d'ensemble de l'absorption intestinale du cholestérol et surtout, un test réalisé dans des conditions parfaitement définies, nous allons maintenant étudier quelques composés stéroliques.

Nous évaluerons leur action inhibitrice sur la résorption intestinale du cholestérol comparativement à l'action exercée par le sitostérol.

Nous envisagerons successivement :

- l'étude d'un stérol saturé : le β -cholestanol ou dihydrocholestérol.

- puis, nous inspirant des travaux de NOLAND sur

"Blatella Germanica", nous étudierons l'action de quatre composés stéroliques voisins du cholestérol :

la cholesténone

la cholestanone

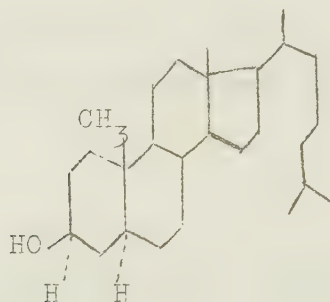
l'acétate de thiocholestérol

le thiositostérol

STEROL SATURÉS : β - CHOLESTANOL ou DIHYDROCHOLESTEROL

C'est un alcool de même structure que le cholestérol, mais dont la double liaison en 5-6 a été saturée par hydrogénation.

Sa formule brute est $C_{27} H_{48} O$, sa formule développée :



Il nous a été fourni par "Delta Chemical Works", New-York.

Depuis les travaux de SCHOENHEIMER et BEHRING, une opinion couramment répandue voulait que les stérols saturés dont le coprostanol et le cholestanol ne soient pas résorbés par la muqueuse intestinale.

Des phytostérols, principalement les stérols du soja, présentaient des propriétés identiques.

On peut encore trouver semblables assertions dans des travaux récents, tel le livre de DEUEL (24) : "The Lipids". Ceci, en dépit du fait que DAM et BRUN aient démontré, dès 1935, que l'ingestion de dihydrocholestérol par des rats était suivie d'une augmentation des stérols saturés de la carcasse et qu'on ne retrouvait pas dans leurs fèces, tout le dihydrocholestérol ingéré (21).

Si phytostérols et stérols saturés étaient incapables de promouvoir leur propre absorption du tractus gastrointestinal, leur présence dans un régime pouvait influencer l'absorption du cholestérol à partir de l'intestin grêle.

Ce fut le point de départ d'expériences fructueuses dont nous avons déjà parlé à propos du sitostérol.

Nous allons rapporter quelques-uns des principaux travaux ayant trait au dihydrocholestérol :

En 1953, SIPERSTEIN, NICHOLS et CHAIKOFF (71) trouvent que l'ingestion de dihydrocholestérol prévient l'élévation du cholestérol plasmatique chez des poulets recevant un régime riche en cholestérol. Il en serait de même chez le Lapin (NICHOLS, SPERSTEIN et CHAIKOFF (59).

D'autres auteurs, BEHER et ANTHONY (4), démontrent que la production du foie gras de type cholestérolique peut être prévenue, chez la Souris, par addition de dihydrocholestérol au régime.

En présence de quantités identiques d'acide cholique et de cholestérol, le dihydrocholestérol semble plus actif que le -sitostérol pour empêcher l'accumulation du cholestérol.

En 1954, ROSENMAN et coll (67) opèrent sur des rats à fistule lymphatique. L'ingestion simultanée de doses égales de cholestérol et de dihydrocholestérol réduit la quantité du cholestérol absorbé retrouvé dans la lymphe thoracique durant les 24 heures qui suivent l'administration des produits.

Les valeurs trouvées sont inférieures de 63 % aux valeurs de contrôle.

Une autre série de rats reçoit un régime contenant 2 % de cholestérol et 1 % d'acide cholique. Une hypercholestérolémie se manifeste. L'addition de 2 % de dihydrocholestérol au régime diminue la vitesse de développement de l'hypercholestérolémie et réduit son intensité.

DASKALAKIS et CHAIKOFF(22) reprennent les recherches en 1955. Ces auteurs emploient le Rat comme animal d'expérience. Ils trouvent que l'ingestion par sonde stomacale de 3 mg de cholestérol marqué produit en 24 heures, dans la lymphe du canal thoracique, un afflux de 32 à 38 % de stérol.

Si par contre, les auteurs administrent 3 mg de dihydrocholestérol en plus des 3 mg de cholestérol, ils voient que la résorption du produit marqué tombe à 6 %.

Le dihydrocholestérol aurait donc le pouvoir d'intervenir au niveau de l'absorption intestinale et il diminuerait de 80 % la résorption du cholestérol.

Nous venons de relater plusieurs expériences marquantes relevées dans la littérature.

Dans nos essais, les résultats que nous avons obtenus et que nous avons exposés tout au long de ce travail, ont montré un effet antagoniste assez limité de la part du sitostérol.

Notre but est d'étudier maintenant l'effet du dihydrocholestérol sur l'absorption intestinale du cholestérol. Ceci comparativement au sitostérol.

Pour ce faire, nous réalisons une expérience identique à l'expérience de bilan, faite avec du sitostérol :

Six rats, d'un poids voisin de 200 grammes, sont mis durant 15 jours, au régime CHAIKOFF.

Sans jeûne préalable, ils reçoivent par sonde stomacale :

(- 0,25 cm³ d'huile de coton contenant 25 mg

de β -cholestanol, suivi de :

(- 0,25 cm³ d'huile de coton additionnée de :

- cholestérol -4-C.¹⁴ dont l'activité correspond à 500.000 c/min.

(- 4 mg de cholestérol entraîneur.

48 heures plus tard, les animaux sont sacrifiés par décapitation.

Les foies, les matières fécales auxquelles on joint l'intestin et son contenu sont traités comme dans l'expérience test.

Les résultats expérimentaux sont groupés dans le tableau n° 40.

On peut voir que :

- 2,85 % du C^{14} ingéré est retrouvé dans la fraction "lipides totaux" du foie.

La digitonine met en évidence une quantité négligeable de sels biliaires.

Pratiquement, toute la radioactivité du foie est sous forme stérolique. Elle est diminuée d'environ 30 % par rapport à l'expérience témoin sans antagoniste.

- Dans les matières fécales :

Les stérols comptés montrent que, par différence, 50,4 % du cholestérol $-4-C^{14}$ a été résorbé.

La forte radioactivité retrouvée dans la fraction saponifiable semble prouver que presque tout le cholestérol $-4-C^{14}$ résorbé a déjà été éliminé.

Ceci serait en accord avec la faible teneur du foie en sels biliaires et en cholestérol radioactifs.

EN CONCLUSION, NOUS POUVONS DIRE QUE :

- L'administration simultanée de cholestérol et de dihydrocholestérol, dans le rapport 1/6 est suivie d'une baisse de l'absorp-

tion du cholestérol. Celle-ci passe de 70 à 50 % -

Le dihydrocholestérol serait donc un inhibiteur plus puissant que le sitostérol.

Il aurait, en outre, la propriété d'empêcher le séjour du cholestérol exogène dans l'organisme. Ce cholestérol alimentaire, réputé nocif, serait promptement éliminé par le foie sous forme de sels biliaires.

- F O I E S -				- B I L A N S F E C A U X -						
Rat n°	Poids du rat	Poids du foie	Lipides totaux à C ¹⁴		Cholestérol-4-C ¹⁴		Radioactivité totale		Stérols à C ¹⁴	
			cps/min.	%	cps/min.	%	cps/min.	%	cps/min.	%
I	218 g.	8,08	7.850	1,6	7.750	1,55	428.000	85,6	248.500	49,7
II	178	6,37	16.250	3,3	15.300	3	480.000	96	214.500	42,9
III	245	9,52	16.770	3,3	15.900	3,2	500.000	100	232.000	46,4
IV	200	8,56	17.125	3,4	16.350	3,2	505.000	101	227.000	45,4
V	204	10	15.600	3,1	15.200	3	475.000	95	287.000	57,4
VI	207	7,93	12.500	2,5	12.300	2,5	425.000	85	281.000	56,2
Moyennes			2,86%		2,7 %		93,7 %		49,6 %	

Si l'on retrouve 49,6 % du C¹⁴ sous forme de stérols radioactifs dans le bilan fécal,

l'absorption du cholestérol-4-C¹⁴ a donc été de :

100 - 49,6 =

50,4 %

AUTRES COMPOSES STEROLIQUES

La lecture d'un travail de NOLAND nous a donné l'idée d'étudier ensuite, chez le Rat, l'action de quelques composés stéroliques particuliers sur la résorption intestinale du cholestérol.

Sachant que tous les insectes demandent une source alimentaire de stérols et que le cholestérol peut, dans tous les cas, satisfaire cette demande, NOLAND a choisi 41 dérivés illustrant des aspects structuraux différents de la molécule de cholestérol. Il a essayé d'établir une corrélation entre les altérations de la molécule et le degré relatif d'utilisation.(61)

Pour cela, il a employé des nymphes de Cafard "Blatella Germanica", nouvellement écloses. Isolées dans des tubes, les nymphes ont reçu pour nourriture un régime sans cholestérol, additionné du produit à essayer.

L'activité de ce dernier est mesurée par le temps plus ou moins long que nécessite une croissance normale des nymphes.

L'auteur a pu voir que :

- les stérols possédant une fonction alcool en 3 : sitostérol, cholestérol, ergostérol étaient bien utilisés.

- Par contre, ceux où cette fonction était remplacée par une cétone, un groupement thio, une amine étaient inaptes à jouer le rôle du cholestérol.

- Des différences de saturation du noyau ou des altérations

de la chaîne latérale semblaient avoir des effets moindres sur la croissance.

Pour l'auteur, l'utilisation de tous ces stérols en tant qu'agents de croissance était liée à l'absorption, celle-ci étant elle-même limitée par l'estérification.

L'auteur s'est aperçu qu'un des composés essayés : le chlorure de cholestéryle, non seulement ne pouvait être utilisé comme stérol de remplacement, mais en plus, avait un effet contrariant sur la croissance lorsqu'il était employé en même temps que du cholestérol à dose minima utile.

Ceci a donné à NOLAND l'idée de faire un second travail sur l'inhibition de l'utilisation du cholestérol par des analogues de structure (62).

31 dérivés du cholestérol, non utilisés comme facteurs de croissance ont été essayés sur des cafards "*Blattella Germanica*".

Des nymphes, isolées comme dans l'expérience précédente, ont reçu des régimes contenant la quantité minima de cholestérol nécessaire à une croissance normale, et le produit à étudier selon différentes proportions.

Quatre dérivés se sont révélés puissants inhibiteurs :

l'acétate de thiocholestérol

le cholestérylméthoxide

le thiocholestérol

le chlorure de cholestéryle

D'autres le sont aussi, mais beaucoup plus faiblement.

L'auteur pense, en conclusion, que les exigences structurales pour une activité inhibitrice de l'utilisation du cholestérol sont liées à une inhibition compétitive de la cholestérol estérase durant le processus de l'absorption du cholestérol.

Nous inspirant de ces travaux, nous avons décidé d'étudier chez le rat, le pouvoir antagoniste éventuel de quatre dérivés:

la cholesténone
la cholestanone
le thiositostérol
l'acétate de thiocholestérol

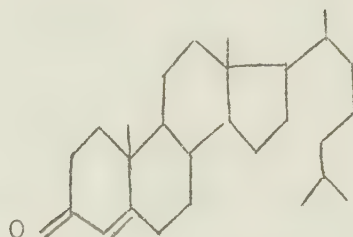
Selon les travaux de NOLAND, ces corps devraient être antagonistes de l'absorption du cholestérol.

On ne peut, tout de même, trop extrapoler. Il est évident que la membrane intestinale du Cafard ne se comporte pas "à priori" comme la paroi intestinale du Rat : une première preuve en est que le sitostérol, absorbé par le Cafard chez lequel il joue le rôle d'un agent de croissance, inhibe en partie chez le Rat, la résorption intestinale du cholestérol.

En conséquence, cette étude a été entreprise très objectivement, en admettant la possibilité d'une action nulle des corps essayés chez le Rat.

- LA CHOLESTENONE -

A cette dénomination courante, correspond la
 Δ 4-cholestène-3-one, dont la formule est :



Une fonction cétone a remplacé la fonction alcool en 3 du cholestérol.

Ce produit nous a été fourni par "L. LIGHT et C^o", Colnbrook-Bucks, England.

Selon NOLAND (61), la transformation de l'alcool en cétone a rendu le produit inapte à assurer la croissance d'un insecte.

En 1953, TOMKINS, SHEPPARD et CHAIKOFF (86) ont démontré que l'administration à des rats d'une dose de cholesténone réduit la capacité du foie des animaux à transformer l'acétate en cholestérol.

A la suite de cette constatation, TOMKINS, NICHOLS et coll. (87) ont donné le même produit en régime prolongé à des chiens. Ils ont noté de sensibles diminutions du cholestérol sérique des animaux, qui baisse par exemple de 100 mg/100 cm³ à 55 mg et de 115 mg à 70 mg en 17 jours.

Des réductions substantielles de la teneur en cholestérol du plasma ont aussi été observées chez des poulets recevant 1% de cholesténone dans leur alimentation.

Nous voulons étudier l'action de ce produit sur l'absorption intestinale du cholestérol :

- 6 rats , pesant environ 185 grammes sont mis durant 15 jours au régime CHAIKOFF. Sans jeûne préalable, on leur administre :

- (- 0,25 cm³ d'huile de coton contenant 25 mg de
- (cholesténone, suivi de :
- (- 0,25 cm³ d'huile de coton additionnée de :
- (-cholestérol-4-C¹⁴ dont l'activité cor-
- (respond à 500.000 c/min.
- (- 4 mg de cholestérol ordinaire comme en-
- (traîneur.

48 heures plus tard, les animaux sont sacrifiés par décapitation. Les organes qui nous intéressent sont traités comme d'habitude.

Les résultats expérimentaux sont groupés dans un tableau n° 41.

On voit que :

5,4 % du C¹⁴ ingéré est retrouvé dans la fraction "lipides totaux" du foie. La digitonine isole 3,95 % de cholestérol-4-C¹⁴.

Un quart de la radioactivité du foie est donc sous forme de sels biliaires.

Dans les matières fécales, la précipitation de 29,1 % de C¹⁴ sous forme de digitonides de stérols est la preuve que 70,9 % du cholestérol-4-C¹⁴ a été absorbé.

On trouve seulement 30 % du C¹⁴, en sels biliaires, éliminés dans les fèces.

EN CONCLUSION - Nous pouvons dire que :

L'administration simultanée de cholestérol et de cholesténone, dans le rapport 1/6, est suivie de l'absorption de 70,9 % du cholestérol.

Le dépôt du cholestérol-4-C¹⁴ dans le foie, 48 heures après l'ingestion est de 3,95 %. La cholesténone réduit, peut-être la capacité du foie à synthétiser du cholestérol à partir de l'acétate (TOMKINS et coll. (86), mais elle n'a pas ici d'effet sur le dépôt du cholestérol exogène dans le foie.

On ne note aucune baisse de l'absorption intestinale du cholestérol sous l'influence de la cholesténone. La Δ^4 -cholesténo-3-one n'est pas antagoniste de la résorption intestinale du cholestérol chez le Rat.

- F O I E S -				- B I L A N S F É C A U X -			
Rat n°	Poids du rat	Poids du foie	Lipides totaux à C ¹⁴		Cholestérol-4-C ¹⁴		Stérols à C ¹⁴
			cps/min.	%	cps/min.	%	
I	178	6,85	39.800	7,9	21.100	4,2	112.000 22,4
II	187	7,54	27.300	5,5	18.250	3,7	127.000 25,4
III	184	7,77	18.400	3,7	16.550	3,3	128.000 25,6
IV	185	6,8	22.000	4,4	19.850	4	221.000 44,2
V	185	8,52	22.800	4,6	17.450	3,5	157.000 31,4
VI	186	8,19	32.200	6,4	24.900	5	130.000 26
Moyennes			5,4		3,95		58,8 29,1

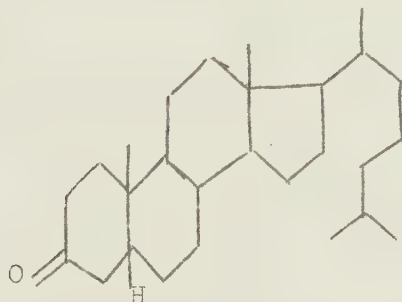
Si l'on retrouve 29,1 % du C¹⁴ sous forme de stérols radioactifs dans le bilan fécal, d'absorption du cholestérol-4-C¹⁴ a donc été de =

100 - 29,1 =

70,9 %

- LA CHOLESTANONE -

C'est une cétone de même noyau que le cholestanol. Elle porte son groupement fonctionnel en position 3. Sa formule développée est la suivante :



Le produit nous a été fourni par "L. LIGHT et C^o" Colnbrook-Bucks, England.

Comme la Δ^4 -cholestène-3-one, elle est inapte à assurer la croissance des insectes en raison de sa fonction cétone.

Pour étudier son action sur l'absorption intestinale du cholestérol, nous opérons sur 6 rats pesant de 140 à 190 grammes.

Les animaux, après 15 jours de régime CHAIKOFF, reçoivent, sans jeûne préalable, un repas-test, constitué de :

- (-0,25 cm³ d'huile de coton contenant 25 mg de
- (cholestanone, suivi de :
- (-0,25 cm³ d'huile de coton additionnée de :
- (-cholestérol-4-C¹⁴ dont l'activité
- (correspond à 500.000 c/min.
- (- 4 mg de cholestérol ordinaire comme
- (entraîneur.

48 heures plus tard, les animaux sont sacrifiés par décapitation. Les organes prélevés sont traités comme d'habitude.

Les résultats expérimentaux sont réunis dans le tableau n°42.

On peut voir que :

- 6 % du C^{14} ingéré est retrouvé dans la fraction "lipides totaux" du foie, dont 5,8 % sous forme de cholestérol-4- C^{14} .

Le foie a donc fixé un fort pourcentage du stérol administré et il recèle très peu de sels biliaires radioactifs.

- Dans les matières fécales :

La présence de 31,2 % de la radioactivité ingérée, sous forme de stérols, montre que 68,8 % du cholestérol-4- C^{14} a été résorbé par la muqueuse intestinale.

La différence entre la radioactivité totale et celle des stérols indique la présence d'une forte proportion de sels biliaires dans les matières fécales.

En CONCLUSION, nous pouvons dire que :

L'administration simultanée de cholestérol et de cholestanone, dans le rapport 1/6, est suivie de l'absorption de 68,8 % du cholestérol.

La fixation du cholestérol dans le foie est de 5,8 %.

On ne note donc aucune baisse de l'absorption intestinale du cholestérol sous l'influence du produit essayé.

La cholestanone, pas plus que la cholesténone, n'est un antagoniste de la résorption intestinale du cholestérol chez le Rat.

RADIOACTIVITE ET RETENUE DES LIPIDES

TABLEAU N° 42

- F O I E S -				B I L A N S F E C A U X						
Rat n°	Poids du rat	Poids du foie	Lipides totaux à C ¹⁴		Cholestérol-4-C ¹⁴		Radioactivité totale		Stércls à C ¹⁴	
			cps/min.	%	cps/min.	%	cps/min.	%		
I	175	8,34	27.800	5,6	28.600	5,7	375.000	75	105.000	21
II	174	8,17	-	-	28.200	5,6	400.000	80	222.000	44,4
III	140	6,96	35.000	7	33.400	6,7	360.000	72	122.750	24,5
IV	145	7,06	34.600	6,9	31.650	6,3	402.000	80,4	152.000	30,4
V	196	8,92	22.300	4,5	22.000	4,4	389.000	77,8	156.500	31,3
VI	158	9,64	31.800	6,4	30.400	6,1	399.000	79,8	183.000	36,6
Moyennes			6 %		5,8 %		77,5 %		31,2 %	

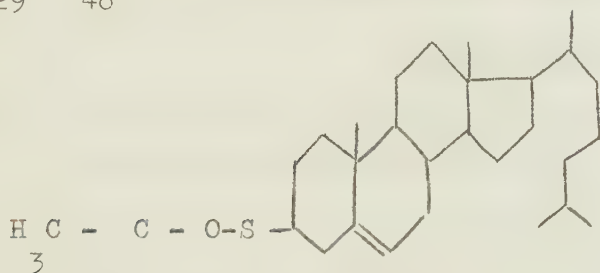
Si l'on retrouve 31,2 % du C¹⁴ sous forme de stércls radioactifs dans le bilan fécal, l'absorption du cholestérol-4-C¹⁴ a donc été de :

68,8 %

100 - 31,2 =

- L' ACETATE DE THIOCHOLESTEROL -

A cette dénomination, correspond un composé de formule brute
C₂₉ H₄₈ OS et de formule développée :



Ce corps a été préparé au laboratoire par Monsieur BRIGNON:

Nous en résumerons brièvement la synthèse :

Elle est longue et nécessite, tout d'abord, la préparation du THIOCHOLESTEROL, (50).

Pour préparer ce corps, plusieurs étapes sont utiles :

1°/ synthétiser du paratoluènesulfocholestérol :

En chauffant doucement, on dissout du cholestérol dans de la pyridine, puis on estérifie en ajoutant du paratoluènesulfochlorure.

On laisse 24 heures à 30°. On ajoute de l'eau au produit de la réaction et on fait cristalliser dans l'acétone.

On recommence une seconde fois l'estérification, en ajoutant du paratoluènesulfochlorure.

A l'aide du composé obtenu, on prépare alors du

2°/ cholestérylisothiuroniumparatoluènesulfonate

Au paratoluènesulfocholestérol, on ajoute de la thiourée et de la pyridine dans de l'alcool absolu.

Après chauffage à reflux durant 3 heures, la solution est diluée avec de l'eau, à chaud, jusqu'à commencement de formation d'un précipité.

On refroidit. On filtre.

Le résidu est mis en suspension dans l'acétone. Cet acétone est chauffé à l'ébullition et le produit insoluble est filtré.

Dans une dernière phase, pour obtenir :

3°/ le thiocholestérol

ce cholestérylisothiuroniumparatoluènesulfonate est chauffé à reflux en présence d'une solution alcoolique de soude.

Lorsque la solution commence à devenir homogène, on lui ajoute de l'eau et on continue à chauffer pendant 2 heures.

La mixture est versée dans de l'eau glacée. Le tout est acidifié par l'acide acétique glacial et agité jusqu'à formation d'un précipité coagulé.

La masse séparée est cristallisée dans l'acétone-méthanol et recristallisée dans l'acétone.

On obtient un corps de PF = 97°5. Analysé, il montre une teneur de :

80,25 % de C
11,61 % de H

alors que la composition théorique du thiocholestérol est de :

80,53 % de C
11,51 % d' H

et le point de fusion 99°.

Il s'agit donc bien du produit désiré.

Reste à synthétiser l'ACETATE DE THIOCHOLESTEROL (91)

Au thiocholestérol obtenu, on ajoute de l'anhydride acétique et de l'acétate de sodium sec. On chauffe à reflux durant 10 heures.

Le produit obtenu est lavé à l'eau pour éliminer toute trace d'anhydride acétique et purifié par plusieurs cristallisations dans l'acétone.

- Son point de fusion est 120°
- Son analyse montre sur deux essais :
 - 10,56 et 10,43 % d'H
 - 77,36 et 77,47 % de C

Alors que les valeurs théoriques pour l'acétate de thiocholestérol sont :

10,8% d' H
78,1 % de C

On peut conclure qu'il s'agit bien du produit souhaité.

Etudié par NOLAND, l'acétate de thiocholestérol s'est révélé très puissant inhibiteur de l'utilisation du cholestérol alimentaire pour la croissance du Cafard. Nous voulons voir s'il en est de même chez le Rat, au niveau de l'absorption intestinale.

6 rats d'un poids voisin de 200 grammes sont soumis au régime CHAIKOFF durant 15 jours; sans jeûne préalable, on leur administre le repas test, constitué de :

- (-0,25 cm³ d'huile de coton contenant 25 mg d'acé-
- (tate de thiocholestérol, suivi de :
- (
- (-0,25 cm³ d'huile de coton contenant :
- (- du cholestérol-4-C¹⁴ correspondant à
- (500.000 c/min.
- (
- (- 4 mg de cholestérol ordinaire comme en-
- (traîneur.

48 heures plus tard, les animaux sont sacrifiés et les organes intéressants, traités comme d'habitude.

Les résultats expérimentaux sont réunis sous forme de tableau : tableau n° 43.

On peut voir que :

3,2% du C ¹⁴ ingéré est retrouvé dans les "lipides totaux" du foie; 2,8% étant sous forme de cholestérol-C ¹⁴ précipitable à la digitonine.

Il y a donc peu de sels biliaires radioactifs dans le foie.

Le dépôt du cholestérol -4-C ¹⁴ est inférieur de 25 % à celui trouvé dans l'expérience test (ingestion de cholestérol seul).

Dans les matières fécales,

La présence de 37,9 % de stérols radioactifs laisse supposer que 62 % du cholestérol administré a été absorbé.

Les sels biliaires radioactifs (36,5 % du C ¹⁴ initial) ne sont pas plus abondants que dans l'expérience test.

EN CONCLUSION, NOUS POUVONS DIRE QUE :

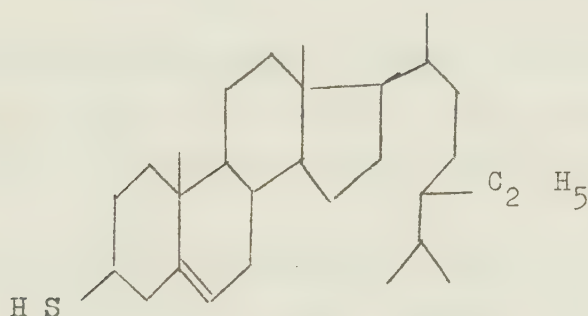
L'administration simultanée de cholestérol et d'acétate de thiocholestérol, dans le rapport 1/6, est suivie d'une légère baisse de l'absorption du cholestérol. Celle-ci passe de 70 à 62%.

L'acétate de thiocholestérol est un inhibiteur assez faible de la résorption intestinale du cholestérol.

Nous n'observons pas, chez le Rat, l'action antagoniste puissante, observée par NOLAND, chez le Cafard.

— LE THIOSITOSTEROL —

Ce stérol a pour formule brute $C_{29}H_{50}S$. Sa formule développée est la suivante :



Comme le stérol précédent, il a été préparé au laboratoire par Monsieur BRIGNON.

Sa synthèse est aussi longue que celle du thiocholestérol et nécessite les mêmes étapes !

- 1°) préparation du paratoluènesulfositostérol
- 2°) puis du sitostérylthiuroniumparatoluènesulfonate
- 3°) et enfin du thiositostérol par hydrolyse à la soude alcoolique du dérivé précédent.

Nous n'expliquerons pas à nouveau les opérations chimiques effectuées, elles sont absolument identiques à celles pratiquées pour le thiocholestérol.

Le produit obtenu au laboratoire a un point de fusion de 127°.

Analysé, il montre une teneur de

12,25 % d'H et 81,61 % de C

alors que la composition théorique du thiositostérol est :

11,9 % d'H et 81 % de C

Il s'agit donc bien du produit souhaité.

NOLAND avait trouvé au cholestérol un pouvoir de facteur de croissance pour le Cafard alors que le thiocholestérol était inapte à jouer ce rôle et était même antagoniste de l'utilisation du cholestérol.

Il en est peut-être de même du thiositostérol qui a subi les mêmes altérations chimiques sur sa molécule.

Nous avons résolu d'étudier l'action de ce corps sur l'absorption intestinale du cholestérol chez le Rat :

- 6 rats d'un poids moyen de 200 grammes, reçoivent, toujours dans les mêmes conditions que pour les expériences précédentes :

- (-0,50 cm³ d'huile de coton contenant 25 mg de thiositostérol (les 25 mg habituels étant insolubles dans 0,25 cm³ d'huile, il nous a fallu doubler la quantité d'excipient).
- (-0,25 cm³ d'huile de coton contenant :
 - (- du cholestérol -4-C¹⁴ correspondant à 500.000 c/min.
 - (- 4 mg de cholestérol ordinaire comme entraîneur.

Les animaux sont sacrifiés 48 heures plus tard.

Bilans fécaux et dépôts dans les foies sont déterminés comme d'habitude, le Tableau n° 44 réunit tous les résultats expérimentaux.

Rat n°	Poids du rat	Poids du foie	Lipides totaux à C ¹⁴		Cholestérol-4-C ¹⁴		Radioactivité totale		Stérols à C ¹⁴	
			cps/min.	%	cps/min.	%	cps/min.	%	cps/min.	%
I	182	5,88	19.460	3,9	19.500	3,9	325.350	65,1	218.120	43,6
II	191	9,12	32.000	6,4	31.500	6,3	456.600	91,3	214.680	42,9
III	215	8,16	28.095	5,6	23.600	4,7	463.000	92,6	217.940	43,6
IV	219	8,63	22.700	4,6	23.400	4,7	480.500	96,1	303.300	60,6
V	176	6,64	23.600	4,7	20.800	4,2	452.890	90,6	256.300	51,2
VI	181	6,38	22.800	4,6	23.000	4,6	449.800	90	217.050	43,4
Moyennes				4,9 %		4,7 %		87,6 %		47,5 %

Si l'on retrouve 47,5 % du C¹⁴ sous forme de stérols radioactifs dans le bilan fécal, l'absorption du cholestérol a donc été de :

100 - 47,5 = 52,5 %

On peut voir que :

4,9 % du C^{14} ingéré est retrouvé dans la fraction "lipides totaux" du foie, dont 4,7 % sous forme de cholestérol $-4-C^{14}$

Le foie a donc fixé autant de cholestérol que dans l'expérience-test. Il n'a presque rien retenu des sels biliaires fabriqués à partir du cholestérol.

Dans les matières fécales

La présence de 47,5 % de stérols à C^{14} montre que par différence 52,5 % du cholestérol ingéré a été résorbé par la muqueuse intestinale.

40 % du C^{14} se trouve déjà dans les fèces sous forme de sels biliaires rejetés par l'organisme. Le corps se débarrasse rapidement du cholestérol absorbé.

EN CONCLUSION, NOUS POUVONS DIRE QUE :

L'administration simultanée de cholestérol et de thiositostérol dans le rapport 1/6, est suivie chez le Rat, d'une baisse de l'absorption intestinale du cholestérol. Celle-ci tombe de 70 à 52,5%.

Le thiositostérol serait un inhibiteur un peu plus puissant que le sitostérol, qui dans les mêmes conditions, provoquait une chute de l'absorption de 70 à 56 %.

Si nous résumons les résultats obtenus dans la IIIème et la IVème Partie de ce travail, nous constatons que :

- Chez le Rat, soumis à un régime équilibré, l'administration en une seule fois, sans jeûne préalable, d'une dose physiologique de cholestérol -4-C¹⁴ est suivie de la résorption intestinale de 70 % du stérol.

L'addition au cholestérol de différents composés stéroliques,
dans le rapport 1/6, peut ou non modifier ce taux de résorption :

Il atteint, en présence de :

- (cholesténone : 70,9 %
- (cholestanone : 68,8 %
- (acétate de thiocholestérol : 62 %
- (sitostérol : 56 %
- (thiositostérol : 52,5 %
- (β -cholestanol : 50 %

EN CONCLUSION :

- la cholesténone et la cholestanone ne sont pas antagonistes de l'absorption intestinale du cholestérol.
- l'acétate de thiocholestérol provoque une légère inhibition.
- Sitostérol, thiositostérol et β -cholestanol montrent une action antagoniste beaucoup plus forte.

Avec aucun des produits essayés, nous ne sommes parvenue à annuler la résorption intestinale du cholestérol.

La plus grande baisse observée n'atteint pas plus de 28,5 % de la valeur normalement trouvée.

MECANISME DE L'ABSORPTION INTESTINALE DU CHOLESTEROL ET MODE
D'ACTION DES ANTAGONISTES

Après les expériences que nous venons de réaliser, il nous faut admettre que les meilleurs inhibiteurs essayés n'exercent tout de même qu'une action très modérée.

A aucun moment, nous ne sommes parvenue à empêcher le passage du cholestérol exogène au travers de la paroi intestinale.

Ces résultats nous amènent à envisager plus spécialement le mécanisme de l'absorption intestinale du cholestérol et le mode d'action des inhibiteurs au niveau de l'intestin.

Depuis longtemps, les auteurs travaillant sur ce sujet ont émis des théories dont nous avons succinctement parlé à différents chapitres de ce travail. Les recherches de ces dernières années ont permis de revoir le problème et de l'envisager sous un angle nouveau.

I - LE MECANISME DE L'ABSORPTION INTESTINALE DU CHOLESTEROL

On a longtemps considéré que pour être absorbé le cholestérol devait subir, dans la lumière de l'intestin, une estérification par un acide gras libre, sous l'influence de la cholestérol-estérase pancréatique.

Des auteurs comme SWELL et ses collaborateurs (77) ont été, à l'origine, des défenseurs de cette théorie.

Mais il a été démontré, depuis, que l'estérification des stérols n'est pas nécessaire à leur fixation par la muqueuse intestinale et qu'elle n'a pas lieu dans la lumière de l'intestin (58,28,37,38,39,40).

Après une administration de cholestérol, FAVARGER (28) ou GLOVER (38) ne retrouvent jamais le stérol sous forme estérifiée dans la paroi intestinale.

SWELL lui-même s'est rendu à l'évidence (84). Dans une expérience (80) l'auteur constate que le cholestérol ou le butyrate de cholestérol sont plus rapidement absorbés que l'oléate ou le linoléate de cholestérol. Un travail précédent a montré que la cholestérol estérase agit plus rapidement pour scinder les esters d'acides gras à courte chaîne que ceux à longue chaîne. SWELL en conclue que le cholestérol est absorbé uniquement sous sa forme libre. Si un ester est administré, la cholestérase est obligée de l'hydrolyser dans la lumière de l'intestin, préalablement à la résorption.

Une autre expérience vient encore battre en brèche les vieilles théories de l'estérification :

Un travail de HERNANDEZ, CHAIKOFF et coll. (45), montre que l'épicholestérol, stéréoisomère du cholestérol, est absorbé aussi facilement que ce dernier. Pourtant, la cholestérol estérase n'agit pas sur cet isomère, on le retrouve sous forme "libre" dans la lymphe du canal thoracique.

Sa résorption est moins rapide que celle du cholestérol et il se pourrait, pensent les auteurs, que l'estérification soit responsable seulement, des différences de vitesse d'absorption du cholestérol et de l'épicholestérol.

Si l'estérification ne joue pas un rôle primordial comment est donc réglée la résorption du cholestérol ?

En opérant le fractionnement des organelles des cellules de la paroi intestinale, par la technique de SCHNEIDER et HOGEBOM,

après administration de cholestérol $-4-C^{14}$ à des rats et à des cobayes, GLOVER et ses collaborateurs (36,37,38,39) constatent la répartition du cholestérol, sous forme libre, dans les mitochondries, les microsomes et le protoplasme.

Utilisant l'électrophorèse et la chromatographie, les auteurs peuvent même préciser que le stérol marqué est présent dans les lipoprotéines des différentes structures cellulaires de la membrane.

Il ne semble pas que le cholestérol, selon l'hypothèse émise par FRAZER pour le mode de résorption des graisses, puisse passer à travers la membrane intestinale à la faveur d'une simple dissolution dans des gouttelettes graisseuses. Ces gouttelettes étant absorbées telles quelles si leur diamètre est inférieur 0, μ 5.

Une telle hypothèse est d'ailleurs contredite par FAVARGER(66): cet auteur montre dans une expérience, que le coefficient de résorption de différents stérols mis en solution dans une même graisse, varie. Pourtant le coefficient de résorption de la graisse reste le même quel que soit le stérol qu'elle contient.

Si les stérols étaient absorbés par le seul fait d'une dissolution, les coefficients d'absorption ne devraient pas varier; les stérols essayés étant à peu près aussi solubles l'un que l'autre dans l'huile utilisée comme véhicule.

De leur côté, GLOVER et GREEN(38) en mettant à incuber une préparation de muqueuse intestinale de Rat avec une émulsion d'huile d'arachide contenant en dissolution du cholestérol $-4-C^{14}$ montrent que le stérol quitte les gouttes de graisse. Il est retrouvé fixé sur les mitochondries et les microsomes.

Comme conclut FAVARGER : "les liaisons lipoprotéidiques sont donc plus fortes que le pouvoir dissolvant des graisses."

GLOVER et MORTON, dans un article du British Medical Bulletin (40), donnent une image assez complète du sort du cholestérol; nous en résumerons ici l'essentiel :

- Tout d'abord, la cholestérol estérase "libère" le cholestérol alimentaire s'il est estérifié.

Les sels biliaires aident à la dispersion de tous les lipides y compris du cholestérol et stimulent l'estérase.

- Les particules colloïdales de lipides sont prises au piège des bordures en brosse des villosités intestinales. Là s'établit un contact avec les mucoprotéines gélatineuses de l'intestin. Celles-ci, de par leur action hydrotropique, ont la possibilité de devenir des véhicules de cholestérol.

- Ces mucoprotéines subissent ensuite un début de digestion et libèrent du cholestérol qui se trouve mis en contact étroit avec la membrane intestinale.

- Le stérol libéré est capté par une lipoprotéine de la paroi d'une cellule épithéliale, et pris, à partir de ce moment dans une sorte d'engrenage.

Les lipoprotéines étagées dans l'épaisseur de la membrane vont échanger, de proche en proche, leur constituant.

Le transport du cholestérol à travers la membrane intestinale et, par là, sa résorption seront le résultat de transferts successifs entre lipoprotéines voisines.

Cette théorie permet d'expliquer pourquoi l'activité spécifique du cholestérol $-4-C^{14}$ de la lymphe est beaucoup plus basse que celle du cholestérol administré (7). Il y aurait un échange entre les stérols préexistant sur les lipoprotéines de la membrane et ceux apportés par la digestion.

L'estérification n'aurait lieu qu'au moment de l'arrivée dans les canaux lymphatiques.

GLOVER et ses collaborateurs remarquent toutefois (38), qu'après un régime chargé en cholestérol, on peut trouver jusqu'à 30 % de cholestérol estérifié dans la paroi de l'intestin.

L'explication donnée par les auteurs est que le transport du stérol libre par les lipoprotéines est limité en capacité.

En cas d'apport massif, une partie du cholestérol entrant dans la cellule est estérifié pour former une réserve temporaire qui persiste jusqu'à ce que la "période de pointe" soit terminée.

Le stérol en excès, rendu inoffensif par estérification, ne peut bloquer les centres d'absorption. Une circulation normale est alors possible.

II - SI TEL EST LE MECANISME DE LA RESORPTION DU CHOLESTEROL, QUEL EST LE MODE D'ACTION DES ANTAGONISTES.?

On a longtemps considéré que des stérols saturés comme le dihydrocholestérol et le coprostérol, ou des phytostérols comme le β -sitostérol n'étaient pas absorbés et demeuraient dans l'intestin.

Pour DAVIS (23), par exemple, l'action antagoniste de ces corps était due à la formation de cristaux mixtes de "stérol antagoniste" et de cholestérol. Ces associations moins facilement dispersées que le cholestérol seul, ne pouvaient se résoudre en couches monomoléculaires et subir l'absorption. De ce fait, elles demeuraient dans la lumière de l'intestin.

Pourtant, DAM et BRUN (21) avaient depuis longtemps laissé entendre que ces "antagonistes", tout particulièrement le dihydrocholestérol étaient susceptibles d'être absorbés au moins dans une certaine proportion.

Le problème fut repris par GOULD (41) avec l'aide de produits radioactifs. Cet auteur établit que, chez le Rat, 10 % du dihydrocholestérol et 8 % du sitostérol, ingérés en une dose unique, pouvaient être résorbés.

L'opinion changea alors. A ce moment, on croyait à la nécessité d'une estérification préalable du cholestérol pour son absorption; on pensa que les "antagonistes" exerçaient leur action en entrant en compétition avec le cholestérol pour l'enzyme, les sels biliaires, les acides gras, : éléments indispensables à l'estérification des stérols (78).

Cette hypothèse eût quelque succès mais plusieurs expériences révélèrent des anomalies difficiles à expliquer :

Selon SWELL, FIELD et TREADWELL (81), le dihydrocholestérol s'estérifiait plus facilement que le cholestérol; le sitostérol, au contraire, moins facilement. Dans ces conditions, comment envisager le rôle de l'estérification, étant donné que les deux stérols essayés ont, à peu près, le même pouvoir inhibiteur sur l'absorption du cholestérol?

Dans le même temps, DASKALASKIS et CHAIKOFF (22) montraient que l'administration de dihydrocholestérol ou d'ergostérol, tout en inhibant à 80 et 50 % l'absorption intestinale du cholestérol, ne changeait pas le pourcentage relatif de cholestérol estérifié retrouvé dans la lymphe thoracique des rats.

Les auteurs en concluaient que des composés comme le dihydrocholestérol, produisaient une inhibition de l'absorption du cholestérol par interférence sur une étape précédant l'estérification.

Les études sur l'absorption propre des "antagonistes" ont été reprises ces dernières années. On s'est aperçu que ces stérols étaient en réalité assez largement résorbés par la muqueuse intestinale.

IVY, LIN et KARVINEN (48) avancent les chiffres de 22 % pour le sitostérol et le dihydrocholestérol. Ces valeurs pouvant même atteindre 35,2 % pour le sitostérol et 34,7 % pour le dihydrocholestérol si les stérols sont ingérés en même temps que de l'acide oléique (47).

FAVARGER (66) évalue à 27,8 % l'absorption du sitostérol en présence de suif et de palmitine et à 27,4 % celle du dihydrocholestérol, dans les mêmes conditions opératoires.

SWELL, TROUT et collaborateurs (82) constatent que 53 % du β -sitostérol marqué administré à des rats n'est pas retrouvé dans les fèces.

Pour COOK et ses collaborateurs (20), la résorption du cholestérol additionné d'huile d'olive pourrait atteindre 90 % chez le Lapin.

Ces données ont bouleversé les idées antérieures sur le problème des "antagonistes".

En accord avec la théorie de GLOVER sur l'absorption du cholestérol, on pense que les "antagonistes" prennent la place de ce dernier dans l'engrenage de lipoprotéines et bloquent ainsi les centres d'absorption. Ils joueraient leur rôle d'autant plus facilement qu'ils seraient plus aisément absorbés par la muqueuse.

Une spécificité stéréochimique interviendrait entre les différents stérols et les lipoprotéines : une différence de structure, la position d'un hydroxyle, la place d'une double liaison, la présence d'un groupement éthyl supplémentaire pourraient être sensibles à la membrane.

Selon FAVARGER : "la paroi intestinale semble traiter chaque lipide individuellement comme si elle traitait les molécules une à une" (66). Mais vis à vis des stérols, cette spécificité n'est pas absolue. "Peut-être découle-t-elle simplement d'une vitesse de transmission différente le long des lipoprotéines qui se succèdent dans l'épaisseur de la membrane et à l'intérieur des cellules?".

Le résultat de cette spécificité est surtout d'ordre quantitatif.

En définitive, comme le pensent IVY, LIN et KARVINEN (48, 52):

dihydrocholestérol, stérols de soja et autres "antagonistes" diminuent certainement l'absorption du cholestérol en entrant en compétition pour la capacité totale du mécanisme d'absorption des stérols sur la base de leur relative absorbabilité.

Une remarque d'ordre pratique et pharmacodynamique s'impose :

Si après ingestion d'un mélange de cholestérol et d'antagonistes, le cholestérol qui aurait dû être résorbé, est remplacé par une certaine quantité d'un autre stérol, la résorption de ce dérivé est-elle inoffensive pour l'organisme ?

A cette question, il semble bien qu'on soit obligé de répondre par la négative.

De nombreux auteurs, parmi lesquels COOK, KLIMAN et FIESER (20) NICHOLS et ses collaborateurs (59,60) trouvent un pouvoir athérogène aux "antagonistes" couramment employés; le dihydrocholestérol, les stérols de soja, la cholesténone produisent à la longue, chez le Poulet et le Lapin, des dépôts athéromateux comme le fait le cholestérol.

Peut-être sont-ils seulement plus rapidement détruits et éliminés sous forme de ses biliaires que le cholestérol (31). Il faudrait donc en ingérer de beaucoup plus grosses quantités pour arriver aux mêmes résultats qu'avec le cholestérol. Ce serait le seul avantage sur ce dernier.

En résumé, l'usage d'une thérapeutique "d'antagonistes" à hautes doses pour faire baisser la cholestérolémie se révèle assez illusoire pour deux raisons :

- Comme nous l'avons vu dans nos expériences, l'inhibition exercée par ces dérivés sur la résorption intestinale du cholestérol est, en valeur absolue, très modérée, tout au moins chez les êtres non sujets à l'hypercholestérolémie post-prandiale.

- D'autre part, ces dérivés introduits dans l'organisme, agissent pour leur propre compte, d'une manière qui se révèle à la longue aussi néfaste que celle du cholestérol.

Ainsi que le font remarquer TOMKINS et ses collaborateurs, lorsqu'on use de tels produits, il y aurait lieu de ne pas se contenter d'évaluer la seule cholestérolémie (87). Il faudrait, au contraire, employer une technique permettant de mesurer les "stérols totaux" du plasma qui bien souvent n'ont pas diminué.

CONCLUSIONS GENERALES

Nous nous étions proposé d'étudier, dans notre travail, l'absorption intestinale du cholestérol. Nous voulions ensuite mesurer l'action de certains composés stéroliques sur cette fonction physiologique.

L'emploi de cholestérol-4-C¹⁴ a exigé la mise au point de méthodes de mesures précises, en plus des modes opératoires chimiques habituels.

Le traitement des tissus et des animaux nous a obligée à appliquer des techniques physiologiques souvent délicates.

I - Dans une première partie, nous avons étudié la fixation du cholestérol par la muqueuse intestinale "in vitro". Des émulsions, contenant du cholestérol, ont été mises en contact avec des morceaux de tunique intestinale de rats.

Nous avons du, tout d'abord, préparer une émulsion convenant à ce genre d'expériences : celles à base d'acide oléique, sels biliaires, et Tween 80 se sont révélées stables et ont été adoptées.

Nous avons vu que la présence de sels biliaires est indispensable pour assurer "in vitro", une bonne fixation intestinale du cholestérol. Par contre, le contenu intestinal où se trouve certainement de la cholestérol estérase pancréatique se révèle superflu pour cette fixation.

Dans des limites physiologiques normales, (de 0 à 5 mg), les doses de cholestérol ordinaire employé comme entraîneur, ne modifient pas le pourcentage de cholestérol-4-C¹⁴ retenu par l'intestin.

Un essai d'inhibition de la fixation du cholestérol par le sitostérol s'est révélé infructueux. Nous avons émis une double hypothèse :

- Ou bien le sitostérol n'agit pas sur cette première étape de l'absorption intestinale que représente la fixation.

- Ou alors, son effet est si faible qu'à un moment donné de la fixation, la différence n'est pas décelable sur un morceau de membrane.

La suite de nos expériences nous porte à pencher maintenant pour cette deuxième solution.

L'effet antagoniste du sitostérol s'exerce chez le rat en diminuant l'absorption intestinal du cholestérol de 70 à 56 %. Cette diminution ne peut être sensible "in vitro" sur nos morceaux d'intestin. Elle est masquée par les écarts individuels notés à chaque expérience sur les muqueuses intestinales de rats différents.

II - Dans une deuxième partie, nous avons voulu étudier les manifestations de l'absorption du cholestérol au-delà de la barrière intestinale.

Utilisant des petits animaux insensibles à l'hypercholestérolémie post-prandiale, nous ne pouvions mesurer des variations du cholestérol sanguin.

Les méthodes chirurgicales, présentant des inconvénients graves, nous n'avons pas voulu faire des mesures du cholestérol de la lymphe du canal thoracique.

Nous avons adopté, pour cette deuxième partie, une technique de mesure des dépôts de cholestérol-4-C¹⁴ dans les foies de souris ayant reçu le stérol 24 heures auparavant.

Nous avons étudié l'influence de la dose de cholestérol ordinaire employé comme entraîneur.

Le cholestérol-4-C¹⁴ utilisé est pondéralement nul. Nous voyons que l'emploi de cholestérol ordinaire à la dose de 2 mg par souris stabilise les taux de fixation trouvés. Ils sont en moyenne de 6,5 %. Des doses plus fortes diminuent ce pourcentage. En présence de 10 mg d'entraîneur, on ne retrouve plus que 3,4 % du cholestérol-4-C¹⁴ ingéré.

L'administration de sitostérol, en même temps, que le cholestérol-4-C¹⁴ exerce un effet inhibiteur important sur le dépôt du stérol marqué dans le foie de la Souris. Cette inhibition est de l'ordre de 60 à 80 % chez les souris traitées.

Le dépôt de cholestérol-4-C¹⁴, dans les foies de souris, n'est cependant pas négligeable, par voie de conséquence, on peut conclure que la résorption intestinale n'a pas été complètement bloquée sous l'influence du sitostérol.

Le métabolisme du cholestérol est certainement très rapide, nous avons craint que les foies n'offrent qu'une image partielle de ce qui se passe en réalité. Pour cette raison :

III - Dans la troisième partie, nous avons établi des bilans fécaux chez des rats.

Cette technique permet de connaître la proportion des stérols ingérés, qui n'ont pas été résorbés par la paroi intestinale et par différence, d'évaluer la digestibilité des stérols.

Une étude préliminaire sur la paroi intestinale des rats nous a permis de déterminer en combien de temps, une dose de cholestérol-4-C¹⁴ est résorbée. Nous avons pu établir qu'en 48 heures, le transit est à peu près terminé.

Une étude parallèle des foies nous a montré que cet organe tend à se débarrasser rapidement de l'apport exogène de stérol. Il le transforme en sels biliaires éliminés par la bile.

Les conditions opératoires étant fixées, l'étude de l'absorption intestinale du cholestérol par la méthode des bilans, montre, chez les rats normaux, une résorption importante atteignant 70 % de la dose administrée et indépendante du régime alimentaire de l'animal.

Cette étude reprise, dans les mêmes conditions, montre que l'administration simultanée de cholestérol et de sitostérol, dans le rapport 1/6, est suivie d'une baisse de l'absorption du cholestérol. Celle-ci passe de 70 à 56 %.

Nous sommes loin de l'action antagoniste totale, notée par mesure de la cholestérolémie post-prandiale, chez des animaux sensibles au cholestérol comme le Poulet ou le Lapin.

L'effet inhibiteur observé ici est très modéré.

La mesure des sels biliaires radioactifs du foie et des matières fécales montre que l'organisme se débarrasse rapidement de l'apport de stérol exogène.

IV - Dans une quatrième partie, nous avons étudié l'action de différents composés stéroliques sur l'absorption intestinale du cholestérol.

Nous avons opéré de la même manière que pour le β -sitostérol.

- Dihydrocholestérol et thiositostérol se révèlent inhibiteurs de l'absorption qu'ils font baisser de 70 % à 50 et 52,5 %.

- L'acétate de thiocholestérol exerce une action antagoniste plus faible, puisqu'il fait seulement descendre l'absorption à 62%.

- Cholesténone et cholestanone sont sans effet.

Contrairement à ce qu'on a longtemps pensé, l'effet "inhibiteur" de ces substances stéroliques est assez illusoire. Ceci pour deux raisons :

- Ils ne sont que des antagonistes "modérés" de l'absorption intestinale du cholestérol.

- Ils sont eux aussi résorbés dans une certaine mesure. Introduits dans l'organisme, ils semblent y produire, à plus ou moins longue échéance, les mêmes méfaits que le cholestérol.

INDEX BIBLIOGRAPHIQUE

(le numéro des tomes a été souligné)

- (1) ALFIN-SLATER (R.B.), WELLS (A.F.), AFTERGOOD (L.), MELNICK (D.)
DEUEL (H.J.Jr).- The effect of plant sterols on cholesterol levels in the rat.
Circul. Res. 1954, 2, 471.
- (2) BALDIN (M.), FAVARGER (P.) - L'absorption intestinale des stérols animaux et végétaux.
Bull. Soc. Chim. Biol. 1958, 40, 1023
- (3) BARUCH (H.), CHAIKOFF (I.L.).- A simplified method for determination of lipide-C 14 in liver.
Proc. Soc. exptl. Biol. Med. 1954, 86, 97.
- (4) BEHER (W.T.), ANTHONY (W.L.).- Prevention of the cholesterol type of fatty livers in mice by dietary dihydrocholesterol.
J. Nutrit. 1954, 52, 519.
- (5) BEHER (W.T.), ANTHONY (W.L.).- Effects of β -sitostérol and ferric chloride on accumulation of cholesterol in mouse liver.
Proc. Soc. exptl. Biol. Med. 1955, 90, 223.
- (6) BERTHOLD-GODEFROY (N.), WOLFF (R.).- La résorption intestinale du cholestérol-4-C 14 chez le rat et l'influence du sitostérol.
C.R. Acad. Sc. 1958, 246, 2825.
- (7) BIGGS (M.W.), FRIEDMAN (M.), BYERS (S.O.).- Intestinal lymphatic transport of absorbed cholestérol.
Proc. Soc. exptl. Biol. Med. 1951, 78, 641.
- (8) BLOCH (K.), BERG (B.N.), RITTENBERG (D.).- The biological conversion of cholesterol to cholic acid.
J. Biol. Chem. 1943, 149, 511.
- (9) BLOOM (B.), CHAIKOFF (I.L.), REINHARDT (W.O.), ENTENMAN (G.), DAUBEN (W.G.).- The quantitative significance of the lymphatic pathway in transport of absorbed fatty acids.
J. Biol. Chem. 1950, 184, 1.

- (10) BUGNARD (L.), CHEVALLIER (F.), COURSAGET (J.).- Utilisation du cholestérol-C 14 pour l'étude de l'absorption et de l'excrétion intestinale du cholestérol chez le rat.
J. Physiologie 1953, 45, 463.
- (11) BURKE (K.A.), Mc CANDLESS (R.F.), KRITCHEVSKY (D.).- Effect of soybean sterols on liver deposition of cholesterol-C 14.
Proc. Soc. exptl. Biol. Med. 1954, 87, 87.
- (12) BYERS (S.O.), BIGGS (M.W.).- Cholic acid and cholesterol : Studies concerning possible intraconversion.
Arch. Biochem. Biophys. 1952, 39, 301.
- (13) BYERS (S.O.), FRIEDMAN (M.).- Observations concerning the production and excretion of cholesterol in mammals. XV.- role of pancreas in intestinal absorption of cholesterol.
Am. J. Physiol. 1955, 182, 69.
- (14) CHAIKOFF (I.L.), TOMKINS (G.M.).- Cholesterol synthesis by liver I.- Influence of fasting and of diet.
J. Biol. Chem. 1952, 196, 569.
- (15) CHAIKOFF (I.L.), HOTTA (S.).- Cholesterol synthesis from acetate in the diabetic liver.
J. Biol. Chem. 1952, 198, 895.
- (16) CHAIKOFF (I.L.), HOTTA (S.), HILL (R.).- Mechanism of increased hepatic cholesterogenesis in diabetes : its relation to carbohydrate utilization.
J. Biol. Chem. 1954, 206, 835.
- (17) COLEMAN (D.L.), WELLS (W.W.), BAUMANN (C.A.).- Intestinal sterols : XXII- Determination of coprostanol and certain related sterols.
Arch. Biochem. Biophys. 1956, 60, 412.
- (18) COOK (R.P.).- Cholesterol feeding and fat metabolism.
Biochem. J. 1936, 30, 1630.
- (19) COOK (R.P.).- "Cholesterol". Chemistry, Biochemistry and Pathology.
Academic Press, Inc. Publishers. 1958.
Chapitre : Metabolism of cholesterol and other sterols par GOULD (R.G.) and COOK (R.P.).
- (20) COOK (R.P.), KLIMAN (A.), FIESER (L.F.).- The absorption and metabolism of cholesterol and its main companions in the rabbit. With observations on the atherogenic nature of the sterols.
Arch. Biochem. Biophys. 1954, 52, 439.

- (21) DAM (H.U.), BRUN (G.C.).- Ein Dihydrocholesterinbilanzversuch an der Ratte.
Biochem. Ztschr. 1935, 276, 274.
- (22) DASKALAKIS (E.G.), CHAIKOFF (I.L.).- The significance of esterification in the absorption of cholesterol from the intestine.
Arch. Biochem. Biophys. 1955, 58, 373.
- (23) DAVIS (W.W.).- Symposium on sitosterol III. The physical chemistry of cholesterol and β -sitosterol related to the intestinal absorption of cholesterol.
Trans. N. York Acad. Sci. 1955, 18, 123.
- (24) DEUEL (H.J.Jr.).- The lipids : their chemistry and biochemistry. Vol. II : Biochemistry : digestion, absorption, transport and storage : page 259.
Interscience Publishers, New York and London. 1955.
- (25) DREISBACH (R.H.), BROWN (B.), MYERS (R.B.), CUTTING (W.C.).- Effect of soy sterols on cholesterol atherosclerosis in rabbits.
Federation Proc. 1953, 12, 317.
- (26) DUMAS (J.).- Les animaux de laboratoire.
Collection de l'Institut Pasteur -
Editions médicales Flammarion.- Paris. 1953
- (27) ENGELHORN (A.), FAVARGER (P.).- L'absorption intestinale des sterols animaux et végétaux.
Bull. Soc. Chim. Biol. 1958, 40, 1023.
- (28) FAVARGER (P.), METZGER (E.F.).- La résorption intestinale du deutérocholestérol et sa répartition dans l'organisme animal sous forme libre et estérifiée.
Helv. Chim. Acta 1952, 35, 1811.
- (29) FAVARGER (P.), GERLACH (J.), ROTH (M.).- Etude de la digestibilité du cholestérol chez le rat.
Helv. Physiol. Acta 1955, 13, 245.
- (30) FAVARGER (P.).- Les mécanismes régulateurs du cholestérol sanguin.
Ann. Biol. Clin. 1957, 3, 156.
- (31) FAVARGER (P.).- Absorption intestinale des stérols animaux et végétaux.
Bull. Soc. Chim. Biol. 1958, 40, 1023.

- (32) FILLIOS (L.C.), ANDRUS (S.B.), MANN (G.V.), STARE (F.J.).- Experimental production of gross atherosclerosis in the rat.
J. Exper. Med. 1956, 104, 539.
- (33) FRIEDMAN (M.), BYERS (S.O.), SHIBATA (E.).- Observations concerning the production and excretion of cholesterol in mammals. X.- Factors affecting the absorption and fate of ingested cholesterol.
J. Exper. Med. 1953, 98, 107.
- (34) FRIEDMAN (M.), BYERS (S.O.).- Pathogenesis of dietary-induced hypercholesterolemia in the rabbit.
Am. J. Physiol. 1954, 179, 201.
- (35) FRIEDMAN (M.).- Failure of absorption of esterified cholesterol in absence of bile.
Federation Proc. 1956, 15, 67.
- (36) GLOVER (M.), GLOVER (J.), MORTON (R.A.).- Provitamin D 3 in tissues and the conversion of cholesterol to 7- dehydro-cholesterol in vivo.
Biochem. J. 1952, 51, 1.
- (37) GLOVER (J.), GREEN (C.).- The distribution of cholesterol and 7-dehydrocholesterol in the intestinal mucosae of the guinea pig.
Biochem. J. 1954, 58, 18.
- (38) GLOVER (J.), GREEN (C.).- Studies on the absorption and metabolism of sterols : Mode of absorption.
Biochemical Problems of Lipids. London.
Butterworths Scientific Pub. 1956, Page 359.
- (39) GLOVER (J.), GREEN (C.).- Sterol metabolism. 3 - The distribution and transport of sterols across the intestinal mucosa of the guinea pig.
Biochem. J. 1957, 67, 308.
- (40) GLOVER (J.), MORTON (R.A.).- The absorption and metabolism of sterols.
Brit. Med. Bull. 1958, 14, 226.
- (41) GOULD (R.G.), LOTZ (L.V.), LILLY (E.M.).- Absorption and metabolism of dihydrocholesterol and β -sitosterol.
Biochemical Problems of Lipids, London.
Butterworths Scientific Pub. 1956, Page 353.
- (42) HAROLD (F.M.), FELTS (J.M.), CHAIKOFF (I.L.).- Fate of cholesterol-4-C ¹⁴ and 26- C ¹⁴ in the perfused liver.
Am. J. Physiol. 1955, 183, 459.

- (43) HERNANDEZ (H.H.), PETERSON (D.W.), CHAIKOFF (I.L.), DAUBEN (W.G.).-- Absorption of cholesterol-4-C ¹⁴ in rats fed mixed soybean sterols and β -sitosterol.
Proc. Soc. exptl. Biol. Med. 1953, 83, 498.
- (44) HERNANDEZ (H.H.), CHAIKOFF (I.L.).-- Do soy sterols interfere with absorption of cholesterol ?
Proc. Soc. exptl. Biol. Med. 1954, 87, 541.
- (45) HERNANDEZ (H.H.), CHAIKOFF (I.L.), DAUBEN (W.G.), ABRAHAM (S.).-- The absorption of C-¹⁴ labeled epicholesterol in the rat.
J. Biol. Chem. 1954, 206, 757.
- (46) HERNANDEZ (H.H.), CHAIKOFF (I.L.), KIYASU (J.Y.).-- Role of pancreatic juice in cholesterol absorption.
Am. J. Physiol. 1955, 181, 523.
- (47) IVY (A.C.), LIN (T.M.), KARVINEN (E.).-- Absorption of dihydrocholesterol and soya sterols when fed with oleic acid.
Am. J. Physiol. (abstracts), 1954, 179, 646.
- (48) IVY (A.C.), LIN (T.M.), KARVINEN (E.).-- Absorption of dihydrocholesterol and soya sterols by the rats intestine.
Am. J. Physiol. 1955, 183, 79.
- (49) KIM (K.S.), IVY (A.C.).-- Factors influencing cholesterol absorption.
Am. J. Physiol. 1952, 171, 302.
- (50) KING (L.C.), DODSON (R.M.), SUBLUSKEY (L.A.).-- Preparation and structure of cholesteryl quaternary salts.
J. Am. Chem. Soc. 1948, 70, 1176.
- (51) KRITCHEVSKY (D.).-- Cholesterol.
New York. John Wiley et Sons, Inc. 1958.
- (52) LIN (T.M.), KARVINEN (E.), IVY (A.C.).-- Capacity of the rat intestine to absorb cholesterol.
Proc. Soc. exptl. Biol. Med. 1955, 89, 422.
- (53) LIN (T.M.), KARVINEN (E.), IVY (A.C.).-- Relation of dietary fat to the absorption and elimination of exogenous and endogenous cholesterol.
Am. J. Physiol. 1955, 183, 86.
- (54) LIN (T.M.), KARVINEN (E.), IVY (A.C.).-- Effect of certain fatty acids on excretion of endogenous cholesterol.
Am. J. Physiol. 1956, 187, 173.

- (55) LIN (T.M.), KARVINEN (E.), IVY (A.C.).- Role of pancreatic digestion in cholesterol absorption.
Am. J. Physiol. 1957, 190, 214.
- (56) LIPMANN (F.), KLEIN (H.P.).- The relationship of coenzyme. A to lipide synthesis: II - experiments with rat liver.
J. Biol. Chem. 1953, 203, 101.
- (57) MANN (G.V.), ANDRUS (S.B.).- Xanthomatosis and atherosclerosis produced by diet in an adult rhesus monkey.
J. Laborat. Clin. Med. 1956, 48, 533.
- (58) METZGER (E.F.), FAVARGER (P.).- Recherche sur la cholestérol-térase des villosités intestinales.
Helv. Chim. Acta 1952, 35, 1805.
- (59) NICHOLS (C.W. Jr.), SIPERSTEIN (M.D.), CHAIKOFF (I.L.).- Effect of dihydrocholesterol (cholestanol) administration on plasma cholesterol and atherosclerosis in the rabbit.
Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 1953, 83, 756.
- (60) NICHOLS (C.W. Jr.), LINDSAY (S.), CHAIKOFF (I.L.).- Production of arteriosclerosis in birds by the prolonged feeding of dihydrocholesterol.
Proc. Soc. exptl. Biol. Med. 1955, 89, 609.
- (61) NOLAND (J.L.).- Sterol metabolism in insects. I.- Utilization of cholesterol derivatives by the cockroach "Blattella Germanica L."
Arch. Biochem. Biophys. 1954, 48, 370.
- (62) NOLAND (J.L.).- Sterol metabolism in insects. II.- Inhibition of cholesterol utilization by structural analogs.
Arch. Biochem. Biophys. 1954, 52, 323.
- (63) PETERSON (D.W.).- Effect of soybean sterols in the diet on plasma and liver cholesterol in chicks.
Proc. Soc. exptl. Biol. Med. 1951, 78, 143.
- (64) PETERSON (D.W.), NICHOLS (C.W. Jr.), SHNEOUR (E.A.).- Some relationships among dietary sterols, plasma and liver cholesterol levels and atherosclerosis in chicks.
J. Nutrit. 1952, 47, 57.
- (65) POLLAK (O.J.).- Successful prevention of experimental hypercholesterolemia and cholesterol atherosclerosis in the rabbit.
Circulation, 1953, 7, 696.

- (66) ROTH (M.), FAVARGER (P.).- La digestibilité des graisses en présence de certains stérols.
Helv. Physiol. Acta, 1955, 13, 249.
- (67) ROSENMAN (R.H.), BYERS (S.O.), FRIEDMAN (M.).- The effect of dihydrocholesterol on the absorption of cholesterol by the rat.
Circul. Res. 1954, II, 45.
- (68) ROSENMAN (R.H.), BYERS (S.O.), FRIEDMAN (M.).- The effect of soybean sterols on the absorption of cholesterol by the rat.
Circul. Res. 1954, II, 160.
- (69) SIPERSTEIN (M.D.), CHAIKOFF (I.L.), REINHARDT (W.O.).- C-I⁴-cholesterol - V - Obligatory function of bile in intestinal absorption of cholesterol.
J. Biol. Chem. 1952, 198, III.
- (70) SIPERSTEIN (M.D.), JAYKO (M.E.), CHAIKOFF (I.L.), DAUBEN (W.G.).- Nature of the metabolic products of C-I⁴ cholesterol excreted in bile and feces.
Proc. Soc. exptl. Biol. Med. 1952, 81, 720.
- (71) SIPERSTEIN (M.D.), NICHOLS (C.W.), CHAIKOFF (M.A.), CHAIKOFF (I.L.).- Prevention of plasma cholesterol elevation in the cholesterol-fed bird by the administration of dihydrocholesterol.
Circulation, 1953, 7, 37.
- (72) SIPERSTEIN (M.D.), CHAIKOFF (I.L.).- Conversion of cholesterol to bile acids.
Federation Proc. 1955, 14, 767.
- (73) SMITH (A.L.), HAUKE (R.), TREADWELL (C.R.).- Uptake of cholesterol and cholesterol esters by inverted sacs of rat intestine.
Am. J. Physiol. 1958, 193, 34.
- (74) SPERRY (W.N.), WEBB (M.).- A revision of the Schoenheimer-Sperry method for cholesterol determination
J. Biol. Chem. 1950, , 187, 97.
- (75) SWELL (L.), BYRON (J.E.), TREADWELL (C.R.).- Cholesterol-esterase. IV - Cholesterol-esterase of rat intestinal mucosa.
J. Biol. Chem. 1950, 186, 543.
- (76) SWELL (L.), FIELD (H.Jr.), TREADWELL (C.R.).- Role of bile salts in activity of cholesterol-esterase.
Proc. Soc. exptl. Biol. Med. 1953, 84, 417.

- (77) SWELL (L.), FLICK (D.F.), FIELD (H.Jr.), TREADWELL (C.R.) - Influence of dietary bile salts on blood cholesterol levels.
Proc. Soc. exptl. Biol. Med. 1953, 84, 428.
- (78) SWELL (L.), BOITER (T.A.), FIELD (H.Jr.), TREADWELL (C.R.).- Esterification of soybean sterols in vitro and their influence on blood cholesterol level.
Proc. Soc. exptl. Biol. Med. 1954, 86, 295.
- (79) SWELL (L.), FLICK (D.F.), FIELD (H.Jr.), TREADWELL (C.R.).- Role of fat and fatty acid in absorption of dietary cholesterol.
Am. J. Physiol. 1955, 180, 124.
- (80) SWELL (L.), BOITER (T.A.), FIELD (H.Jr.), TREADWELL (C.R.).- Absorption of dietary cholesterol esters.
Am. J. Physiol. 1955, 180, 129.
- (81) SWELL (L.), FIELD (H.Jr.), TREADWELL (C.R.).- Sterol specificity of pancreatic cholesterolesterase.
Proc. Soc. exptl. Biol. Med. 1955, 87, 216.
- (82) SWELL (L.), TROUT (E.C.Jr.), VAHOUNY (G.V.), FIELD (H.Jr.), VON SCHUCHING (S.), TREADWELL (C.R.).- Influence of H 3- -sitosterol on sterol excretion.
Proc. Soc. exptl. Biol. Med. 1958, 97, 337.
- (83) SWELL (L.), TROUT (E.C.Jr.), HOPPER (J.R.), FIELD (H.Jr.), TREADWELL (C.R.).- Specific function of bile salts in cholesterol absorption.
Proc. Soc. exptl. Biol. Med. 1958, 98, 174.
- (84) SWELL (L.), TROUT (E.C.Jr.), HOPPER (J.R.), FIELD (H.Jr.), TREADWELL (C.R.).- Mechanism of cholesterol absorption.
I.- endogenous dilution and esterification of fed cholesterol-4-C¹⁴.
J. Biol. Chem. 1958, 232, I.
- (85) THIAVILLE-DUBOST (S.) - Contribution à l'étude du métabolisme du cholesterol et des acides gras dans des coupes de foie de rat à l'aide d'acétate marqué.
Thèse de Sciences. Nancy. 1958.
- (86) TOMKINS (G.M.), SHEPPARD (H.), CHAIKOFF (I.L.).- Cholesterol synthesis by liver.
IV.- suppression by steroid administration.
J. Biol. Chem. 1953, 203, 781.

- (87) TOMKINS (G.M.), NICHOLS (C.W.Jr.), CHAPMAN (D.D.),
HOTTA (S.), CHAIKOFF (I.L.).- Use of Δ^4 -cholesténone
to reduce the level of serum cholesterol in man.
Science, 1957, 125, 936.
- (88) UMBREIT (W.W.), BURRIS (R.H.), STAUFFER (J.F.).- Manometric
techniques and related methods for the study of tissue
metabolism.
Minneapolis. 1945.
- (89) VAHOUNY (G.V.), WOO (C.H.), TREADWELL (C.R.).- Quantitatives
effects of bile salt and fatty acid on cholesterol
absorption in the rat.
Am. J. Physiol. 1958, 193, 41.
- (90) VUILLEMIN-WEIS (J.).- L'absorption intestinale de la vitamine
B 12 chez le rat.
Thèse de Sciences - Nancy. 1957.
- (91) WALLIS (E.S.), FERNHOLZ (E.), GEPHART (F.T.).- Molecular
rearrangements in the sterols.-
I.- The action of anhydrous potassium acetate on
cholesteryl-p-toluenesulfonate in acetic anhydride
solution.
J. Am. Chem. Soc. 1937, 59, 137.
- (92) WELLS (W.W.), COLEMAN (D.L.), BAUMANN (C.A.).- Intestinal
sterols.- I.- Δ^7 -cholestenol and 7-dehydrocholesterol
in feces.
Arch. Biochem. Biophys. 1955, 57, 437.
- (93) WELLS (W.W.).- Coprostanol formation.
I.- The effect of sodium taurocholate and tween 80
on sterol composition of rat feces.
Arch. Biochem. Biophys. 1957, 66, 217.
- (94) WILSON (T.H.), WISEMAN (G.).- The use of sacs of everted small
intestine for the study of the transference of substances
from the mucosal to the serosal surface.
J. Physiologie, 1954, 123, 116.
- (95) WOLFF (R.), BRIGNON (J.J.).- Recherches expérimentales sur
la résorption intestinale du cholestérol chez le lapin.
Bull. Soc. Chim. Biol. 1956, 38, 99.

- TABLE DES MATIERES -

	<u>Page</u>
Introduction	1
Historique	4
Exposé des techniques générales	12
 <u>Ière Partie</u> : Essai d'étude de la fixation du cholestérol-4-C ¹⁴ par la muqueuse intestinale de rat "in vitro"	
	34
- Techniques physiologiques et chimiques spé- ciales	39
- Expériences	45
Mise au point d'une formule d'émulsion .	45
Action de différents facteurs sur la fixation	
Rôle des sels biliaires	52
Rôle du contenu intestinal	57
Rôle du cholestérol entraîneur	62
Essai d'étude de l'antagonisme sitostérol- cholestérol	67
 <u>IIème Partie</u> . Technique "in vivo". Etude de dépôts de cholestérol dans les foies de souris	
	72
- Techniques physiologiques et chimiques spécia- les	78
- Expériences	80
Détermination du taux de cholestérol-4-C ¹⁴ , retrouvé dans les foies de souris 24 heu- res après l'ingestion du stérol	80
Influence de la dose de cholestérol employé	82
Action du β -sitostérol sur le dépôt du cholestérol-4-C ¹⁴ dans le foie	87

<u>IIIème Partie</u> : Etablissement de bilans fécaux chez des	
rats recevant du cholestérol-4-C ¹⁴	90
- Techniques physiologiques et chimiques spéciales	97
- Expériences	107
Etude cinétique de l'absorption intestinale du cholestérol	107
Evaluation de l'absorption intestinale du cholestérol-4-C ¹⁴ chez le rat	121
Mesure de l'effet antagoniste du β -sitostérol	125
 <u>IVème Partie</u> : Etude de l'action de quelques composés	
stéroliques sur l'absorption intestinale du cholestérol	128
β -cholestanol ou dihydrocholestérol	130
cholesténone	139
cholestanone	143
acétate de thiocholestérol	146
thiositostérol	151
 Mécanisme de l'absorption intestinale du cholestérol et mode d'action des "antagonistes"	
	156
 Conclusions générales	 165
 Index bibliographique	 169
 Table des matières	 178

Vu,
Nancy, le 7 Mars 1960
Le Président de Thèse,
Signé : F. KAYSER

Vu et approuvé
Nancy, le 7 Mars 1960
Le Doyen de la Faculté de Pharmacie
Signé : F. KAYSER

Vu et permis d'imprimer
Nancy, le 8 Mars 1960
Le Recteur de l'Académie
Président du Conseil de l'Université
Signé : G. MAYER

